



Facultad de
Ciencias Agrarias
y Forestales



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE LA PLATA

Comunidades microbianas asociadas a la remoción de fenantreno en suelo: efecto de la aplicación de *Medicago sativa* L. en el proceso de biorremediación

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Facultad de Ciencias Agrarias y
Forestales

Diego Daniel Hariyo

Licenciado en Ciencias Biológicas, FCNyM-UNLP

Directores de tesis: Dr. Marcelo D. Barrera

Dr. Mario C. N. Saparrat

Lugar de trabajo:

Laboratorio de Investigación de Sistemas Ecológicos y Ambientales (LISEA),
CONICET, UNLP. La Plata.

Instituto de Fisiología Vegetal (INFIVE), UNLP, CCT, CONICET. La Plata.

Buenos Aires, 2020

Comunidades microbianas asociadas a la remoción de fenantreno en suelo: efecto de la aplicación de *Medicago sativa* L. en el proceso de biorremediación

Resumen

Los hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAHs) son contaminantes ambientales que llegan al ambiente vía combustión incompleta de crudo de petróleo y derrames accidentales de productos petroquímicos. A nivel ambiental, los PAHs son tóxicos comúnmente encontrados en suelos y sedimentos de zonas industriales, son electroquímicamente estables y pueden ser extremadamente tóxicos, poniendo en riesgo la salud humana y ecológica. Una técnica habitual para remediar zonas contaminadas consiste en la utilización de plantas, estrategia conocida como fitorremediación, que se basa en la acción combinada de las plantas y sus comunidades microbianas asociadas para degradar compuestos tóxicos ubicados en suelos.

A fin de evaluar el potencial de la fitorremediación como una estrategia para reducir el impacto del fenantreno en el suelo y el rol de los exudados en el proceso, se analizó en un sistema de diferentes microcosmos la estructura y dinámica de las comunidades microbianas que intervienen en el proceso de rizodegradación y se cuantificó el fenantreno residual, la actividad deshidrogenasa y el número de hongos y bacterias.

El capítulo 2 se centró en analizar comparativamente la cinética de la degradación del fenantreno en un suelo artificialmente contaminado e implantado con plántulas de *M. sativa* así como también evaluar la actividad degradadora de los microorganismos asociados.

En el capítulo 3 se caracterizaron las comunidades microbianas de un suelo artificialmente contaminado con fenantreno e implantado con *M. sativa* y sus variaciones a lo largo del proceso.

Por último, en el capítulo 4 se analizó el efecto de extracto de raíces de *M. sativa* sobre la remoción de fenantreno en un suelo artificialmente contaminado y sobre la comunidad microbiana asociada.

Se observó que el tratamiento de fitorremediación estuvo asociado a una mayor riqueza y diversidad bacteriana. Aunque una sucesión de OTUs (*Operational Taxonomic Unit*) en el tiempo se detectó en los tratamientos, se demostró que las variables riqueza y diversidad están condicionadas por la concentración de fenantreno,

que a la vez, según el tratamiento, poseen diferentes comunidades bacterianas. Según lo expuesto, a lo largo del proceso de fitorremediación existen cambios predecibles en la estructura de la comunidad bacteriana que pueden ser de utilidad para mejorar las técnicas de remediación de suelos contaminados con PAHs. En este estudio, la fitorremediación proporcionó una significativa reducción en el contenido de fenantreno en el suelo después de 56 días, con un 0,45 % residual comparado al tratamiento control (4,25 %).

Palabras clave: Biorremediación, fitorremediación, rizodegradación, PAHs

Microbial communities associated with the removal of phenanthrene in soil: effect of the application of *Medicago sativa* L. in the bioremediation process

Abstract

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are environmental pollutants that reach the environment via incomplete combustion of crude oil and accidental spills of petrochemical products. At the environmental level, PAHs are toxic commonly found in soils and sediments of industrial areas, are electrochemically stable and can be extremely toxic, putting human and ecological health at risk. A common technique to remedy contaminated areas is the use of plants, a strategy known as phytoremediation, which is based on the combined action of plants and their associated microbial communities to degrade toxic compounds located in soils.

In order to evaluate the potential of phytoremediation as a strategy to reduce the impact of phenanthrene on the soil and the role of exudates in the process, the structure and dynamics of the microbial communities involved in a system of different microcosms were analyzed. The rhizodegradation process and the residual phenanthrene, dehydrogenase activity and the number of fungi and bacteria were quantified.

Chapter 2 focused on comparatively analyzing the kinetics of the degradation of phenanthrene in an artificially contaminated soil implanted with *M. sativa* seedlings as well as evaluating the degrading activity of the associated microorganisms.

In Chapter 3, the microbial communities of a soil artificially contaminated with phenanthrene and implanted with *M. sativa* and its variations throughout the process were characterized.

Finally, in chapter 4 the effect of *M. sativa* root extract on the removal of phenanthrene in an artificially contaminated soil and on the associated microbial community was analyzed.

It was observed that the phytoremediation treatment was associated with greater bacterial richness and diversity. Although a succession of OTUs (Operational Taxonomic Unit) in time was detected in the treatments, it was shown that the variables wealth and diversity are conditioned by the concentration of phenanthrene, which at the same time, according to the treatment, have different bacterial communities. According to the above, throughout the phytoremediation process there are predictable changes in

the structure of the bacterial community that may be useful to improve the remediation techniques of soils contaminated with PAHs. In this study, phytoremediation provided a significant reduction in the content of phenanthrene in the soil after 56 days, with a 0.45% residual compared to the control treatment (4.25%).

Keywords: Bioremediation, phytoremediation, rhizodegradation, PAHs.

Trabajo publicado en revista con referato:

Título: Changes in microbial communities during phytoremediation of contaminated soil with phenanthrene

Revista: Brazilian Journal of Microbiology

Código: BJMI-D-19-00939R2

Autores: Hariyo, D.; Barrera M.; Saparrat M.

Agradecimientos

Esta tesis no existiría si no fuera por dos grandes personas, gente buena de verdad y excelentes científicos, mis directores: Marcelo Barrera y Mario Saparrat. Aprendí muchísimo de ellos, a nivel académico y humano. No me alcanzan las palabras para expresar mi agradecimiento. Nunca me voy a olvidar de su esfuerzo y apoyo incondicional. Los aprecio muchísimo.

Al hermano menor que me dio la vida, Adrián "el hacker" Tagliavini, un genio de la informática. Gracias por ayudarme con todo el software de análisis de geles, imágenes, matrices, estadística, ecología, etc, etc. A vos amigo, gracias.

A mi querida amiga Dai Katriniuk, Any & Aemonn. Publicar en inglés tan prolijamente no hubiera sido posible sin su ayuda. Siempre estás cerca y ayudando Dai por más que la vida te lleve al rincón menos pensado del planeta.

A la Dra. Irma Morelli por enseñarme a dar los primeros pasos en ecología microbiana y biorremediación allá por el 2006 en el Cindefi. Gracias también al Dr. Edgardo Donati en ese momento director del Cindefi, a la Dra. Teresa del Panno y a mis compañeros del L8: Bibi, Agus, Laurita, Romy, Manuel, Ani, Jorge, Sabri, Fla, Vero y por supuesto a Clau Terrada que tanta ayuda me brindó en esa época con los recuentos y diversas tareas.

A todo el personal de apoyo del Cindefi, a Katy que me esterilizaba todo. Gracias fue una linda época que recuerdo con mucho cariño.

A mi querida familia, en especial a los que me aguantan y apoyan día a día Pitu, Miky, Nany y Santy. A mí abuelo Humbert que ya no está, pero siempre me bancó en todo. Gracias también a mi hermano Marcelo, que cultivó en mí, desde niño, el amor por la ciencia.

Y por último, gracias a la Universidad Nacional de La Plata, que me brindó y sigue brindando educación pública, gratuita y de alto nivel. Al Laboratorio de Investigación de

Sistemas Ecológicos y Ambientales (LISEA), CONICET, UNLP. y al Instituto de Fisiología Vegetal (INFIVE), UNLP, CCT, CONICET.

Índice

| | |
|---|----|
| CAPÍTULO 1: Introducción general..... | 10 |
| 1.1 Antecedentes del tema..... | 11 |
| 1.1.1 Los hidrocarburos policíclicos aromáticos y la contaminación del suelo | 11 |
| 1.1.3 El suelo, un ecosistema complejo..... | 13 |
| 1.1.3.1 Definición, composición y estructura de suelo..... | 13 |
| 1.1.3.2 Ecología de suelo..... | 16 |
| 1.1.3.2 Estudio de la ecología microbiana del suelo..... | 17 |
| 1.1.4 La rizósfera..... | 18 |
| 1.1.4.1 Definición y generalidades..... | 18 |
| 1.1.4.2 El rol de los exudados radiculares en la activación microbiana.... | 19 |
| 1.1.4.3 Coeficiente rizosférico..... | 21 |
| 1.1.5 Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos..... | 22 |
| 1.1.5.1 Definición y aspectos generales..... | 22 |
| 1.1.5.2 Rizodegradación..... | 23 |
| 1.1.5.3 Utilización de Medicago sativa en estrategias de rizoremediación.. | 24 |
| 1.1.5.4 Situación actual de las técnicas y protocolos para el estudio de la rizodegradación..... | 24 |
| 1.1.6 Uso del fenantreno como modelo de PAH..... | 26 |
| 1.2 Objetivos del trabajo e hipótesis más relevantes..... | 26 |
| 1.2.1 Objetivos específicos..... | 27 |
| 1.3 Hipótesis más relevantes..... | 27 |
| CAPÍTULO 2: Evaluación del potencial remediador de Medicago sativa a través del análisis comparativo de dos sistemas artificiales contaminados con fenantreno.... | 28 |
| 2.1 Introducción..... | 29 |
| 2.2 Objetivo..... | 30 |
| 2.3 Material y métodos..... | 30 |
| 2.3.1 Preparación de las unidades de estudio..... | 30 |

| | |
|---|----|
| 2.3.2 Muestreo y análisis de las unidades de estudio..... | 32 |
| 2.3.3 Análisis estadístico | 34 |
| 2.4 Resultados..... | 34 |
| 2.4.1 Concentración residual de fenantreno y su cinética de degradación..... | 34 |
| 2.4.2 Actividad deshidrogenasa como estimador de la actividad microbiana..... | 36 |
| 2.4.3 Número de bacterias heterótrofas y hongos cultivables..... | 37 |
| 2.4.4 Número de microorganismos degradadores de PAH..... | 39 |
| 2.5 Discusión..... | 40 |

CAPÍTULO 3: Estructura y dinámica de las comunidades bacterianas del suelo a lo largo del proceso de fitorremediación..... 42

| | |
|---|----|
| 3.1 Introducción..... | 43 |
| 3.2 Objetivo..... | 44 |
| 3.3 Material y métodos..... | 44 |
| 3.3.1 Extracción de ADN total..... | 45 |
| 3.3.2 Amplificación del segmento gen 16S rRNA mediante reacción en cadena de la polimerasa: PCR (polymerase chain reaction)..... | 45 |
| 3.3.3 Separación de los Amplicones utilizando un gel de gradiente desnaturalizante: DGGE (Denaturing gradient gel electrophoresis)..... | 45 |
| 3.3.4 Análisis de la comunidad bacteriana..... | 46 |
| 3.3.4.1 Cálculo de índice de Shannon..... | 46 |
| 3.3.4.2 Curvas de rarefacción..... | 49 |
| 3.3.4.3 Análisis multivariados (Análisis de componentes principales y Análisis de Correspondencia Canónica)..... | 50 |
| 3.4 Resultados..... | 50 |
| 3.4.1 Análisis de los geles obtenidos por PCR-DGGE..... | 50 |
| 3.4.2 Estructura comunitaria bacteriana..... | 54 |
| 3.3.4 Análisis multivariados..... | 56 |
| 3.3.4.1 Análisis de componentes principales (ACP)..... | 56 |
| 3.3.4.2 Análisis Canónico de Correspondencia..... | 58 |
| 3.4 Discusión..... | 60 |

| | |
|---|----|
| CAPÍTULO 4: Análisis del efecto producido por un extracto de raíces de <i>M. sativa</i> sobre la remoción de fenantreno y sobre la dinámica de comunidad microbiana asociada..... | 63 |
| 4.1 Introducción..... | 64 |
| 4.2 Objetivo..... | 65 |
| 4.3 Material y métodos..... | 65 |
| 4.3.1 Preparación de las unidades de estudio..... | 65 |
| 4.3.2 Análisis de las unidades de estudio..... | 66 |
| 4.3.3 Análisis de la comunidad bacteriana..... | 67 |
| 4.3.3.1 Cálculo de índice de Shannon..... | 67 |
| 4.3.3.2 Curvas de rarefacción..... | 67 |
| 4.3.3.3 Análisis multivariados (Análisis de componentes principales y Análisis de Correspondencia Canónica)..... | 67 |
| 4.3.4. Análisis estadístico de datos..... | 67 |
| 4.4 Resultados..... | 68 |
| 4.4.1. Concentración residual de fenantreno y su cinética de degradación..... | 68 |
| 4.4.2 Actividad deshidrogenasa como estimador de la actividad microbiana.... | 69 |
| 4.4.3 Número de bacterias heterótrofas y hongos cultivables..... | 71 |
| 4.4.4 Número de microorganismos degradadores de PAH..... | 73 |
| 4.4.5 Análisis de la comunidad microbiana PCR-DGGE..... | 74 |
| 4.4.6 Estructura de la comunidad bacteriana..... | 78 |
| 4.4.5.2 Análisis multivariados (Análisis de componentes principales y Análisis de Correspondencia Canónica) | 80 |
| 4.5 Discusión..... | 84 |
| CAPÍTULO 5: Conclusiones Generales..... | 87 |
| 5.1 Conclusiones..... | 88 |
| 5.2 Perspectivas futuras..... | 90 |
| BIBLIOGRAFÍA..... | 91 |

Capítulo 1

Introducción General

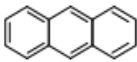
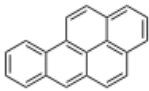
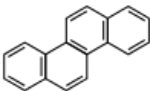

1.1 Antecedentes del tema


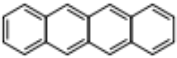
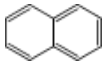
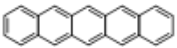
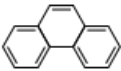
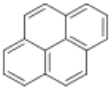
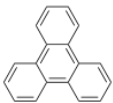

1.1.1 Los hidrocarburos policíclicos aromáticos y la contaminación del suelo

Químicamente los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP o PAH, este último por sus siglas en inglés) son compuestos orgánicos que se componen de anillos aromáticos condensados, que no contiene heteroátomos ni llevan sustituyentes (Fetzer 2000). En la Figura 1.1 se puede observar su clasificación según la *International Union of Pure and Applied Chemistry*, IUPAC.

Los HAP son un grupo de más de 100 compuestos químicos diferentes que se forman durante la combustión incompleta de materiales como el carbón, petróleo y gasolina, basura y otras sustancias orgánicas como el tabaco, y se encuentran generalmente como una mezcla de dos o más de estos compuestos, (Fetzer 2000). Algunos de los PAHs son sintetizados en la industria. Estos PAHs puros generalmente son sólidos incoloros, blancos o amarillo-verde pálido. Los PAHs se encuentran en el petróleo crudo, creosota y alquitrán para techo, aunque unos pocos se usan en medicamentos o para fabricar tinturas y pesticidas (Agencia para sustancias tóxicas y el registro de enfermedades, ATSDR, 1996).

Figura 1.1 Clasificación de PAHs según la nomenclatura de fusión IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry* 1993)

| Compuesto químico | Fórmula esqueletal | Compuesto químico | Fórmula esqueletal |
|-------------------|---|-------------------|---|
| Antraceno |  | Benzo[a]pireno |  |
| Criseno |  | Coroneno |  |

| | | | |
|-------------|---|-----------|---|
| Coranuleno |  | Naftaceno |  |
| Naftaleno |  | Pentaceno |  |
| Fenantreno |  | Pireno |  |
| Trifenileno |  | Ovaleno |  |

A nivel ambiental, los PAHs son tóxicos comúnmente encontrados en suelos y sedimentos de zonas industriales, que se producen durante la combustión incompleta de material orgánico a través de pirólisis, siendo abundantes también en los combustibles fósiles (Helmi et al. 2012). Son electroquímicamente estables y pueden ser extremadamente tóxicos, poniendo en riesgo la salud humana y ecológica (Burchiel et al. 2001). Las propiedades físicas y químicas de los PAH contribuyen a su persistencia en el medio ambiente, tanto en sus formas iniciales como químicamente transformadas (Lundstedt et al. 2001).

Los niveles más altos de contaminación del suelo, con una importante persistencia ligada a fenómenos de adsorción a la materia orgánica, comúnmente ocurren en antiguos sitios de obras para la extracción de hidrocarburos y donde existen actividades industriales que utilizan petróleo y carbón en sus procesos, como la industria metalúrgica, la refinación de petróleo, calcinado de carbón coque, generación de energía térmica, producción de papel alquitranado y madera (Díaz Puerto 2015)

Dentro de los hidrocarburos contaminantes del suelo, los PAHs son los que mayor atención y desafío han tenido por parte de la comunidad científica para establecer técnicas de biorremediación o mejorar las ya existentes, debido a que son

considerados sustancias peligrosas para la salud y el medio ambiente por sus cualidades que a continuación se detallan:

En su mayoría generan actividad carcinogénica en animales (Hernández et al. 2017).

Por tratarse de sustancias no metabolizables o difíciles de metabolizar y desechar, son acumuladas en algún tejido, principalmente en el adiposo por ser solubles en lípidos. Pueden provocar la mutación de células, dando como resultado diferentes tipos de cáncer. Son difíciles de degradar por la comunidad descomponedora (Pérez et al. 2016).

1.1.2 El suelo, un ecosistema complejo

1.1.2.1 Definición, composición y estructura del suelo

Se denomina suelo a la parte superficial de la corteza terrestre, biológicamente activa, que proviene de la desintegración o alteración física y química de las rocas y de los residuos de las actividades de seres vivos que se asientan sobre ella (Villalaz 2004).

Su formación resulta de la alteración superficial del material geológico subyacente por la acción combinada del clima y de los organismos vivos a lo largo de extensos períodos de tiempo, bajo condiciones diversas de topografía o relieve local (Wilding et al., 1983).

La estructura del suelo hace referencia al agrupamiento de las partículas primarias de arena, limo y arcilla en partículas compuestas, llamadas agregados o pedios, cuyas propiedades difieren de las que presenta una masa igual de partículas primarias no agregadas (Six et al. 2000).

La estructura deriva en gran parte de la composición mineral del suelo, ya que en la agregación de las partículas individuales juega un papel esencial la presencia de una matriz arcillo-húmica y de otros minerales secundarios que establecen enlaces débiles entre ellas. La estructura interviene, junto a la textura, en la determinación de las propiedades del suelo que controlan el movimiento del agua, la transferencia de calor, la porosidad, la aireación, la densidad aparente y la reflectancia. (Six et al. 2000).

La estructura vertical del suelo está compuesta por una serie de capas o estratos de desigual anchura denominadas horizontes. A su vez, a un conjunto de horizontes se le denomina perfil del suelo. El Soil Survey Division Staff (SSDS 1993) propuso la potencial diferenciación de 6 horizontes o capas en el suelo, los cuales simboliza con

las letras mayúsculas: O, A, E, B, C y R. como se puede ver en Tabla 1.1. Se observa en detalle en la Figura 1.2.

En 1998, el *Soil Survey Staff* adicionó el símbolo W a la lista anterior para indicar la presencia de capas de agua dentro del suelo.

Tabla 1.1 Horizontes del suelo (SSDS 1998)

- Horizonte O: Son porciones del suelo dominadas por materiales orgánicos
- Horizonte A: Capa compuesta por minerales que se encuentran en la superficie del terreno o por debajo del horizonte O. Presentan acumulación de materia orgánica humificada, íntimamente mezclada con la fracción mineral del suelo y propiedades resultantes de actividades de disturbación como laboreo y pastoreo.
- Horizonte E: Horizonte mineral que se caracteriza por presentar pérdidas de arcillas y/o sesquióxidos de Fe y Al, generando una acumulación de partículas de arena y limo.
- Horizonte B: Horizonte mineral en el cual se ha perdido casi todo vestigio de la estructura original del material parental y se observan rasgos pedológicos como: acumulación iluvial de arcillas, hierro, aluminio, carbonatos, yeso y/o sílice.
- Horizonte C: Horizonte que ha sido muy poco afectado por procesos pedogenéticos, se incluyen sedimentos, saprolitos y fragmentos de roca poco consolidados, que exhiben baja a moderada resistencia a la excavación. Abarca aquellas porciones del suelo que tienen acumulaciones de sílice, carbonatos, yeso o sales más solubles, aún endurecidas, que no presenten relación genética con los horizontes suprayacentes.
- Horizonte R: Este estrato se reserva para las rocas duras, las cuales son difíciles de excavar, aunque pueden ser fragmentadas con maquinaria pesada.

Figura 1.2 Horizontes de un suelo representado.



Fuente: http://www.revistaalcuza.com/REVISTA/articulos/GestionNoticias_376_ALCUZA.asp

Los suelos son un medio heterogéneo y dinámico, con propiedades químicas, físicas y biológicas variables incluso a escalas espaciales microscópicas, que dificultan su estudio (Yaron et al. 1996). Los conceptos “calidad” y “salud” del suelo son una manera de evaluar las características generales del mismo en función de sus cualidades.

La “calidad” de un suelo es el grado de aptitud del mismo para desempeñar una función determinada, por lo tanto ésta puede variar cuando se pretende darle un uso diferente (Carter et al. 1997).

El concepto de salud del suelo se relaciona con las características biológicas, químicas y físicas, siendo el más fiel reflejo de su funcionalidad. Aunque no puede medirse directamente, se puede inferir a partir de la determinación de Indicadores (Arias et al. 2009).

El término “salud” incorpora aquellas características o atributos ecológicos que tienen implicancias más allá de su calidad o capacidad para cumplir una determinada

función. Esas características son las que están estrechamente relacionadas con la biota del suelo, la biodiversidad, la actividad y la estructura de la red trófica.

La resiliencia del suelo, es su capacidad para recuperarse en respuesta a las perturbaciones naturales o antropogénicas (Cuevas-Reyes 2010).

Esta recuperación puede verse reducida de manera significativa si la composición de organismos que viven en el suelo se altera. En los últimos años, especialmente a partir de la incorporación del concepto salud del suelo, existe un enorme interés por estudiar diferentes propiedades del suelo para ser utilizadas como potenciales indicadores de “calidad” o “salud” del mismo. Entre estos, los indicadores biológicos presentan varias ventajas sobre los químicos o físicos, entre las que se destacan: (i) su carácter integrador de la totalidad de las propiedades físicas, químicas y biológicas que definen el ecosistema suelo en el tiempo y en el espacio; y (ii) su capacidad para responder con sensibilidad y rapidez a los cambios y perturbaciones introducidas en ese ecosistema. El seguimiento de cambios en los indicadores biológicos puede utilizarse como señal de monitoreo y alarma ante una posible perturbación severa del sistema, de forma que los gestores y agricultores puedan reaccionar con la antelación requerida antes de que se originen modificaciones irreversibles (Pankhurst 1997).

1.1.2.2 Ecología del suelo

El suelo es uno de los principales reservorios de la biodiversidad del planeta. Constituye un importante hábitat para todos los organismos como hongos, bacterias, protistas, invertebrados, vertebrados menores y plantas (Hoorman et al. 2011). La biodiversidad del suelo se ha estimado en tres órdenes de magnitud por encima de la biodiversidad del planeta (Curtis et al. 2002; Crawford et al. 2005; Curtis et al. 2005).

En promedio, cada gramo de suelo contiene mil millones de células bacterianas, siendo difícil definir el número de especies presentes. En parte porque menos del 1% de estos microorganismos se pueden cultivar in vitro y en parte porque el suelo es complejo y heterogéneo (Simonet 2016).

Además, un solo gramo de suelo puede contener aproximadamente 10^4 protozoos, unos 10^4 nematodos (Hinsinger et al. 2009), y una importante biomasa de hongos representada por unos 25 a $37\mu\text{g C g}^{-1}$ suelo seco (Pereira et al. 2014). Sin embargo, debido a la gran superficie que presenta un gramo de suelo ($20\text{m}^2/\text{g}$) y el

pequeño tamaño de la mayoría de estos organismos, su cobertura es de solo 10^{-5} – 10^{-6} % (Young y Crawford 2004).

En el suelo los organismos se distribuyen de forma discreta. Existe una tendencia de los microorganismos del suelo a formar colonias y agregados con una importante actividad metabólica, algunos de ellos constituyendo biofilms asociados a diferentes superficies, tanto biológicas como inertes (Watt et al. 2006).

Desde un enfoque ecológico los microorganismos participan en el reciclado de la materia en los ecosistemas y por tanto, controlan la evolución de la biosfera al interactuar de forma dinámica en los ciclos biogeoquímicos (Lyautey et al. 2005)

La mayoría de las comunidades del suelo sufren perturbaciones intermitentes como sequía, congelamiento, exposición a altas concentraciones salinas y otras alteraciones causadas por las variaciones naturales del entorno o por la actividad humana. Estos factores ambientales estresantes crean oportunidades para que nuevas especies se establezcan o predominen dentro de la comunidad. Una perturbación fuerte puede causar la desaparición del microhábitat y la disrupción de los límites entre poblaciones, lo que permitirá que los recursos locales estén disponibles para una mayor proporción de la masa microbiana total, es decir, más individuos pero menos especies (Torsvik y Ovreas 2002).

En términos de ecología microbiana, la abundancia y distribución de las especies, pueden usarse para describir la estructura de la comunidad. Existen índices como el índice de Shannon-Weaver y el de Simpson, entre otros para calcular la diversidad, modelos biológicos y teóricos para explicar la distribución del número de especies en clases de abundancias. La utilización de estas medidas se hace dentro de un contexto funcional, es decir, la diversidad o el reparto de los individuos entre las especies es consecuencia de interacciones ecológicas entre ellas, de las relaciones entre éstas y su medioambiente (Magurran 2004).

1.1.2.2 Estudio de la ecología microbiana del suelo

Antes de la aparición de técnicas moleculares, los estudios de diversidad microbiana solo se basaban en recuentos de placas o el análisis del número más probable, dos técnicas limitadas, ya que sólo estima entre el 1% y 10% de las especies totales, correspondiente a bacterias y hongos cultivables (Johnsen et al. 2001).

La incapacidad de cultivar hongos y bacterias presentes en un hábitat determinado, ha sido parcialmente suplida por la posibilidad de aislar y caracterizar el material genético de la comunidad microbiana residente en dicho medio (Yang et al. 2007).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), desarrollada por K. Mullís en la década de los 80 (Mullís et al. 1987; Mullís 1990), es la metodología empleada para la amplificación selectiva de secuencias de ácidos nucleicos. Mediante esta técnica es posible realizar sucesivas amplificaciones a partir de pequeñas cantidades de ADN, ofreciendo así la posibilidad de realizar análisis en el ADN y ARN asociados a diversas muestras complejas de suelo para poder hacer inferencias sobre la composición poblacional o de la comunidad (Kim et al. 2007).

La caracterización de los procariotas existentes en muestras ambientales se puede llevar a cabo, utilizando la información que proporcionan los genes que codifican el ARN ribosomal, en particular el gen que codifica la subunidad menor del ribosoma bacteriano, ARNr 16S. Esta molécula está presente en todas las bacterias y en donde desempeñan una misma función. Si bien tiene limitaciones, dado que diferentes regiones de la molécula presentan diferente grado de variabilidad en secuencia entre los diferentes taxa bacterianos, es útil en los estudios comparativos con varios niveles de resolución (Colé et al. 2005).

A través del estudio de los amplicones 16S ARNr obtenidos mediante PCR utilizando la técnica de electroforesis en gel de gradiente desnaturizante (DGGE) se puede detectar diferencias en el comportamiento de pequeños fragmentos (200-700 pb) de genes. Los oligonucleótidos que se utilizan en este análisis deben contener en el extremo 5 una secuencia rica en GC de unas 40 bases, denominada grapa GC (GC-clamp), cuya función es impedir la desnaturalización completa y la aparición de hebras de ADN de cadena sencilla. A través de la desnaturalización progresiva del ADN o ADNc amplificado se obtiene un patrón de bandas que permite identificar y cuantificar la diversidad genética presente en una microbiota (Muyzer et al. 1993). Cada banda obtenida es considerada una OTU (Unidad Taxonómica Operativa por sus siglas en Inglés Operational Taxonomic Unit), es una unidad de clasificación seleccionada por el investigador que la utiliza para individualizar los objetos de su estudio, en ecología microbiana generalmente una especie, u otro taxón de cualquier categoría en otras disciplinas taxonómicas (Colín et al. 2006). La intensidad de cada

banda indica la abundancia relativa de poblaciones específicas en la comunidad. (Escalante 2007).

La técnica de DGGE puede ser utilizada para estudiar la biodiversidad en el suelo, ampliando el panorama de estudio a los microorganismos no cultivables a partir del análisis de las bandas obtenidas (Guo et al. 2017).

1.1.3 La rizósfera

1.1.3.1 Definición y generalidades

En 1904 el ingeniero agrónomo y fisiólogo alemán Lorenz Hiltner acuñó el término "rizósfera" para describir la interfaz entre la raíz de una planta y el suelo (Hartmann et al. 2008). Esta área está asociada a una comunidad específica de microorganismos modulados por los exudados de las raíces.

La rizósfera se puede definir también como el volumen de suelo que está influenciado por la actividad de la raíz (Hartmann et al. 2008). La exudación de compuestos por parte de la raíz condiciona la extensión radial de la rizósfera, incluso pudiendo variar de unas pocas micras hasta varios centímetros (Hinsinger et al. 2009). Asimismo ello es dependiente de las propiedades del suelo, como el tamaño de partícula, el contenido de agua y la capacidad reguladora del pH (Junk et al. 2002).

Existe un beneficio mutuo entre las raíces de las plantas y sus microorganismos asociados y han co-evolucionado junto con los suelos, contribuyendo al desarrollo de los mismos (Verboom et al. 2006; Lambers et al. 2009). Las raíces de las plantas estimulan las comunidades microbianas de la rizósfera mediante la liberación de enzimas, metabolitos y nutrientes a través de sus exudados. Al mismo tiempo, proporcionan superficie para la colonización y diferentes nichos que protegen a los microorganismos de la desecación y otros tipos de estrés abiótico y biótico (Segura et al. 2009). Por otro lado, los microorganismos rizosféricos pueden favorecer el crecimiento de las plantas mediante su participación en la fijación de nitrógeno, la movilización de diferentes nutrientes, la producción de reguladores del crecimiento, la protección contra patógenos y la degradación de los contaminantes (Kent et al. 2002).

En consecuencia, estas interacciones conocidas como efecto rizosférico, resultan en un incremento en el número de microorganismos, y son responsables de una variación de la diversidad y una alta actividad metabólica, capaz de promover el desarrollo de las plantas en comparación con el resto del suelo (Martin et al. 2014).

1.1.3.2 El rol de los exudados radiculares en la activación microbiana

Los productos químicos secretados en el suelo por las raíces se conocen en general como exudados de raíz. Mediante la exudación de una amplia variedad de compuestos, las raíces pueden modular la comunidad microbiana del suelo en su vecindad inmediata, hacer frente a herbívoros, fomentar interacciones beneficiosas, alterar las propiedades químicas y físicas del suelo e inhibir el crecimiento de especies de plantas competidoras (Nardi et al. 2000).

La capacidad de la raíz para secretar una amplia gama de compuestos en la rizósfera es una de las características metabólicas más notables de las raíces de las plantas. Entre un 5% y un 21% de todo el carbono fijado fotosintéticamente es transferido a la rizósfera a través de exudados de raíz (Marschner 1995). Este fenómeno es variable y es dependiente de la intensidad de la luz, la temperatura, el tipo de planta, el estado nutricional, los factores de estrés, la actividad microbiana en la rizósfera y el tipo de suelo, entre otros (Hawes et al. 2003). En plantas anuales, se ha demostrado que el 30 al 60% del carbono neto fijado es exudado y finalmente secuestrado o respirado por los microorganismos asociados a la raíz (Lynch et al. 1990).

Las raíces liberan al entorno inmediato una gran variedad de sustancias y productos de bajo y alto peso molecular, incluyendo azúcares simples, aminoácidos, polisacáridos, proteínas y ácidos orgánicos, además de restos celulares (Hawes et al. 2003).

La composición de exudados de la raíz cambia con las etapas de desarrollo de la planta y depende también de la especie de planta, siendo estas variaciones las moduladoras de diferentes efectos sobre la comunidad rizosférica (Garbeva et al. 2004).

No todos los componentes de los exudados radiculares son orgánicos, también se han detectado la liberación de protones, oxígeno y agua. Los exudados se pueden clasificar de acuerdo a su función en excreciones (CO_2 , iones de bicarbonato, etileno, etc.) y secreciones (mucílagos, enzimas, sideróforos, protones etc.) siendo los primeros utilizados para facilitar el metabolismo interno y el segundo para facilitar procesos externos como la absorción de nutrientes (Uren 2007).

La respiración en la rizósfera es mucho mayor que la respiración en el suelo no rizosférico, y en general, es altamente dependiente de las condiciones climáticas, la

disponibilidad de nutrientes y la exudación de la raíz, la cual es controlada por la velocidad de la fotosíntesis durante los periodos de luz (Kim y Verma 1992).

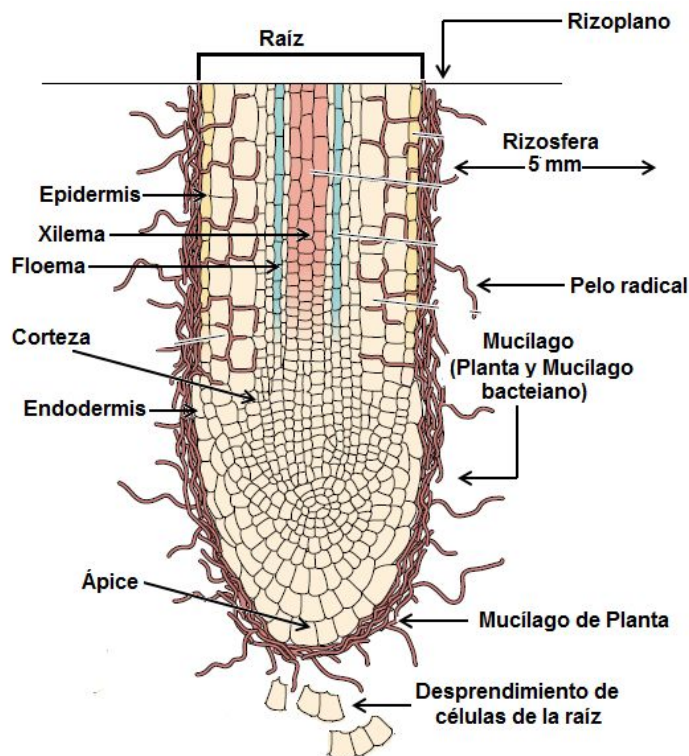
La actividad enzimática es generalmente más alta en la rizósfera que en el suelo no rizosférico, como resultado de una mayor actividad microbiana sostenida por los exudados de las raíces (Bengtsson et al. 2003).

Según varios estudios, existen diversos factores que modulan la comunidad microbiana dentro de las raíces y en la rizósfera, incluyendo:

- El volumen y la naturaleza de los exudados liberados por la planta a la rizósfera (Dennis et al. 2010)
- Los mecanismos de señalización e interacción planta- microbios (Zhu et al. 2014)
- El sistema inmune de la planta y la producción de sustancias alelopáticas (Jones et al. 2006).

Mediante estos procesos las plantas reclutan y sostienen activamente ciertos microorganismos e inhiben a otros, modificando la comunidad en el ambiente de la rizósfera (Hernández et al. 2015). En la figura 1.3 se puede observar un esquema de la rizósfera.

Figura 1.3 Rizósfera



1.1.3.3 Coeficiente rizosférico

El efecto de la rizósfera se puede medir a través del coeficiente rizosférico (R/S) que representa la proporción de microorganismos en esta zona con relación al suelo no rizosférico. La estimulación en esta zona es diferencial ya que no todos los grupos fisiológicos se ven beneficiados. En general los microorganismos más exigentes en factores de crecimiento son los que proliferan en mayor proporción (Bashan 2010).

1.1.4 Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos

1.1.4.1 Definición y aspectos generales

Se define como biorremediación a cualquier proceso que utiliza microorganismos, hongos, plantas o enzimas derivadas de ellos para retornar a su condición natural un medio ambiente alterado por contaminantes (Crawford 2002).

En los últimos años, con el objetivo de eliminar hidrocarburos de suelos contaminados, se han desarrollado diferentes estrategias económicamente atractivas y amigables con el medio ambiente comparados con los métodos físicos/químicos disponibles. Todos estos procedimientos se basan en el aprovechamiento de las capacidades metabólicas de los microorganismos para degradar y/o detoxificar los contaminantes (Kathi et al. 2011; Thijs et al. 2016)

Dentro de la biorremediación una técnica habitual consiste en la utilización de plantas para remediar zonas contaminadas, estrategia conocida como fitorremediación (Truu et al. 2015). La fitorremediación se basa en la acción combinada de las plantas y sus comunidades microbianas asociadas para degradar, remover, transformar o inmovilizar compuestos tóxicos ubicados en suelos, sedimentos y aguas contaminadas (Truu et al. 2015).

Las ventajas de la fitorremediación en comparación con las técnicas convencionales son el menor costo, la baja perturbación del medio ambiente, la aceptación del público y la posibilidad de remediar diversos contaminantes. El uso de plantas en combinación con microorganismos asociados a éstas ofrece un mayor potencial para la biorremediación de compuestos orgánicos (Truu et al. 2015).

Según la US-EPA (United States Environmental Protection Agency) existen seis técnicas básicas de fitorremediación, ellas son:

- Fitoextracción: Es la captación de iones metálicos por las raíces de las plantas y su acumulación en tallos y hojas, para luego ser cosechadas y tratadas.

- Rizofiltración: Este procedimiento hace uso de raíces de plantas para descontaminar agua superficial, subterránea o efluentes líquidos contaminados con metales pesados, tóxicos orgánicos, entre otros contaminantes.
- Fitoestabilización: Es una tecnología para la estabilización física, química y biológica de sitios mineros en el largo plazo. Los contaminantes son absorbidos por las raíces de las plantas, donde son acumulados en formas inocuas, evitando así los efectos tóxicos sobre otros seres vivos e impidiendo que se afecten las napas subterráneas.
- Fitodegradación: Es un proceso por medio del cual las plantas degradan compuestos orgánicos. Los compuestos son absorbidos y metabolizados. Muy frecuentemente los metabolitos que producen tienen actividad de fitohormonas (aceleran el crecimiento de las plantas). Se han encontrado plantas que degradan residuos de explosivos, disolventes clorados y herbicidas.
- Fitovolatilización: Cuando los árboles absorben agua contaminada con compuestos orgánicos volátiles y los eliminan en el proceso de evapotranspiración a través de las hojas.
- Rizodegradación: Los contaminantes orgánicos pueden biodegradarse debido a la intensa actividad microbiológica que se desarrolla en las raíces, siendo esta última objeto de estudio de este trabajo doctoral.

1.1.4.2 Rizodegradación

Se denomina rizodegradación a la descomposición de un compuesto orgánico xenobiótico a través de la actividad microbiana que se ve potenciada en la zona de las raíces (Zand et al. 2016).

La rizodegradación también se conoce como la degradación asistida por la planta. En este sentido, las raíces de las plantas modifican las condiciones del suelo generando alteraciones como el aumento de la aireación y la regulación del contenido de humedad, creando condiciones más favorables para la biodegradación. Por otro lado, los efectos químicos y físicos de los exudados también aumentan la biodisponibilidad de los contaminantes y la actividad microbiana (US-EPA 2000).

1.1.4.3 Utilización de *Medicago sativa* en estrategias de rizorremediación

Medicago sativa L. es una especie de planta herbácea perteneciente a la familia de las Fabaceae (leguminosas), perennifolia, erecta a suberecta, pudiendo alcanzar un tamaño de 30-60 cm de altura (Linne 1753).

A nivel ecológico, como muchas leguminosas, tiene la capacidad de formar asociaciones simbióticas con bacterias del suelo, encargadas del proceso de fijación de nitrógeno. (Peña et al. 2011). Además, *M. sativa* tiene valor como forraje debido a su alto contenido en proteína (17-22 % en base a la materia verde). Asimismo, la planta desecada no solo incluye nutrientes, sino también componentes bioactivos (Gholami et al. 2014).

Las leguminosas son del tipo de planta que más invierten en destinar el carbono fijado fotosintéticamente a la síntesis de exudados radiculares (Oliveros et al. 2009).

Una particularidad de los representantes de este grupo que interesa en el campo de la biorremediación es la habilidad para acidificar el suelo y así incorporar el P no disponible. Este atributo puede estar asociado al aumento de la disponibilidad de PAHs inmovilizados en arcillas y el humus (Akifumi et al. 2012).

Todas estas características conducen a *M. sativa* como una especie atractiva para su empleo en la fitorremediación.

1.1.4.4 Situación actual de las técnicas y protocolos para el estudio de la rizodegradación

En la actualidad existen numerosos trabajos de biorremediación, vinculados a la incesante degradación que sufren los suelos en zonas industriales o agrícolas y la creciente preocupación por desarrollar técnicas que permitan la remediación económica y eficaz de los mismos (Razzaq 2017).

Estudios anteriores han demostrado que la utilización de plantas y sus microorganismos asociados, para remediar suelos contaminados con PAH podría ser una solución eficaz y económica al problema (Cui et al. 2017; Guo et al. 2017; Wei et al. 2016). Sin embargo, todavía existen varias limitaciones en las técnicas utilizadas en el estudio de la rizodegradación a fin de mejorar la eficiencia del proceso en base a los valores residuales en las zonas tratadas biológicamente. Además, se deben mejorar

los protocolos existentes para alcanzar mayores niveles de sostenibilidad ambiental y económica (Thijs et al. 2016).

Las intervenciones actuales donde se utilizan técnicas de rizodegradación no siempre dan los resultados esperados en los entornos de campo, que podría deberse a la falta comprensión de las interacciones biológicas de múltiples componentes. Por lo tanto, el estudio de las comunidades microbianas representa un desafío prometedor para mejorar las tasas de biorremediación (Thijs et al. 2016).

Aunque las capacidades de biodegradación de los microorganismos y la expresión de sus genes a nivel de la rizósfera son extremadamente importantes para la eliminación eficaz de los contaminantes vía rizodegradación, otros aspectos como la elección de la especie vegetal adecuada, la selección de las mejores combinaciones planta-microorganismos y el uso de microorganismos modificados genéticamente son alternativas para mejorar la eficacia del proceso, siendo incluso necesarios más estudios (Lui et al. 2015).

Trabajos anteriores han evaluado diferentes especies vegetales de leguminosas y gramíneas con el objeto de optimizar el proceso de rizodegradación, incluso evaluando las concentraciones finales de hidrocarburos luego del tratamiento y su tolerancia a suelos contaminados (Basumatary et al. 2012; Masu et al. 2013).

En los últimos años, se han desarrollado técnicas innovadoras como el empleo de humedales artificiales para el tratamiento de lodos contaminados con PAHs proveniente de zonas industriales, que han mejorado significativamente la eficacia de la rizodegradación, logrando mejorar significativamente los valores residuales del xenobiótico al finalizar el tratamiento (Cui et al. 2017)

Una solución efectiva en lugares donde el clima no permite el crecimiento de comunidades degradadoras podría ser el uso de microorganismos recombinantes, a pesar de ello, se necesitan más estudios de impacto ambiental para cumplir con los requisitos de seguridad.

Finalmente, algunos autores afirman que la rizodegradación es una caja negra donde un contaminante es degradado sin conocerse todas las etapas y procesos implicados (Smets 2017; Ouvrard et al. 2014). El estudio en profundidad de la ecología microbiana en la rizósfera, la cinética de degradación de los contaminantes y su actividad enzimática, podrían optimizar las técnicas para la rizodegradación de PAHs en el campo.

1.1.5 Uso del fenantreno como modelo de PAH

El fenantreno PAHs, compuesto por tres anillos bencénicos fusionados en un modelo angular. Esta molécula posee dos regiones principales llamadas “región Bahía” y “región K” y es frecuentemente utilizada como sustrato modelo para estudios sobre metabolismo carcinogénico de los PAHs (Mallick et al. 2007). La “región Bahía” se forma entre los carbonos 4 y 5, mientras que la “región K” se forma entre los carbonos 9 y 10. La importancia de estas regiones estriba en el hecho de que el ataque microbiológico es específico en alguna de ellas dependiendo del microorganismo y la enzima involucrada en el proceso (Sanchez et al. 2010).

La velocidad de la biodegradación está en general limitada por la cantidad de oxígeno como suplemento y por los factores relacionados a la biodisponibilidad tales como la solubilidad, la velocidad de disolución y de sorción. (Wang et al. 1998).

El fenantreno es utilizado como compuesto modelo para el estudio de la biodegradación de los PAH dado que:

- Se encuentra en altas concentraciones en muestras ambientales (Cui et al. 2017).
- Porque el fenantreno es estructuralmente similar a los contaminantes ambientales carcinogénicos.
- Debido a la presencia de regiones, como antes mencionadas, B y K, que son atacadas por diferentes grupos de microorganismos.

1.2 Objetivos del trabajo e hipótesis más relevantes

Este trabajo pretende aportar información sobre la rizodegradación de fenantreno como modelo de PAH, estudiando el comportamiento de las comunidades microbianas rizosféricas, la cinética de degradación en diferentes condiciones y el rol de los exudados radiculares en el proceso.

El objetivo general es fitorremediar suelos contaminados con PAHs como el fenantreno y estudiar el efecto de la aplicación de *M. sativa* en la promoción de la actividad degradadora de los microorganismos asociados.

1.2.1 Objetivos específicos

- 1-Analizar comparativamente la cinética de la degradación del fenantreno en un suelo artificialmente contaminado e implantado con plántulas de *M. sativa* así como también evaluar la actividad degradadora de los microorganismos asociados.
- 2-Characterizar las comunidades microbianas de un suelo artificialmente contaminado con fenantreno e implantado con *M. sativa* y sus variaciones a lo largo del proceso.
- 3- Analizar el efecto de extracto de raíces de *M. sativa* sobre la remoción de fenantreno en un suelo artificialmente contaminado y sobre la comunidad microbiana asociada.

1.3 Hipótesis más relevantes

- 1- Las plántulas de *Medicago sativa* aceleran la degradación de fenantreno en un suelo artificialmente contaminado.
- 2- Existen diferencias en la riqueza y diversidad de las comunidades microbianas del suelo y su actividad degradadora de fenantreno bajo el efecto de *Medicago sativa*.
- 3- Los extractos radiculares de *Medicago sativa* son claves en la activación de la microbiota involucrada en la degradación de fenantreno.

Capítulo 2

Evaluación del potencial remediador de *Medicago sativa* a través del análisis comparativo de dos sistemas artificiales contaminados con fenantreno

2.1 Introducción

La fitorremediación es una tecnología que se basa en la acción combinada de las plantas y sus comunidades microbianas asociadas para degradar, eliminar, transformar o inmovilizar compuestos tóxicos localizados en suelos y sedimentos (Truu et al. 2015).

Se ha reportado en varios trabajos que la degradación de PAH en la rizósfera es significativamente mayor en comparación con la de los suelos no plantados (Fan et al. 2008; Liuet al. 2013). De hecho, el efecto positivo de las plantas en la eliminación de PAH se atribuye principalmente a la mejora de la actividad microbiana general y al aumento de la solubilidad de los PAH a través de exudados radiculares (Cébronnet et al. 2011; Louvel et al. 2011; Thomas y Cebon 2016). Por otra parte, está bien documentado el efecto de la rizósfera para aumentar la biomasa y la diversidad microbiana al liberar nutrientes, exudados y oxígeno en los suelos (D'Orazio et al. 2013; Muratova et al. 2015).

Sin embargo, otros estudios han informado sobre la tendencia contrastante que las plantas o exudados no tienen ningún efecto o incluso un efecto inhibitor sobre la degradación de PAH, tal como se verificó en un estudio con Pireno en suelos contaminados por varios años, no se observaron diferencias significativas en la degradación al aplicar plantas (Rezek et al. 2008; Phillips et al. 2012). Varios autores creen que estos estudios no siempre dan los resultados esperados debido a una comprensión incompleta de las interacciones biológicas y los procesos implicados (This et al. 2016; Guo et al. 2017).

2.2 Objetivo

El objetivo principal de este capítulo fue analizar comparativamente dos sistemas de suelo contaminados artificialmente con fenantreno, uno de ellos implantado con plántulas de *M. sativa*, para evaluar la eficacia de la fitorremediación analizando la cinética de degradación del contaminante y la actividad degradadora de los microorganismos asociados.

2.3 Material y métodos

2.3.1 Preparación de las unidades de estudio

Se llevó a cabo un experimento que consistió en dos tratamientos de suelo contaminado con fenantreno (2000 ppm), uno implantado con plántulas de *M. sativa* de 21 días de crecimiento a razón de 1 plántula / 4cm², 150 plántulas en total (F2000+R) y otro control con suelo contaminado (F2000) en terrarios bajo condiciones controladas de temperatura, humedad y fotoperíodo, a 25°C, humedad 20%, y fotoperíodo 14:10, respectivamente. Se realizaron 3 réplicas de cada terrario.

Se utilizó un suelo sin antecedentes de contaminación que se tomó de un área cercana a la ciudad de La Plata, Argentina. (El Parque Pereyra Iraola). Sobre una alícuota de una muestra compuesta del suelo originario, se analizaron diferentes propiedades fisicoquímicas. Estas determinaciones se realizaron en el Laboratorio de Ciencias del Suelo Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales (UNLP) mostrando las siguientes propiedades fisicoquímicas: una textura arcillosa, un pH de 5.8 a 5.9, 3.6 % de carbono orgánico, 6.21 % de materia orgánica, 0.296 % de nitrógeno total y 0.00042 % de fósforo disponible.

La muestra compuesta de suelo fue tamizada con un tamiz de 2 mm x 2 mm de poro y homogeneizada a fin de obtener una matriz para el ensayo, Figura 2.1.

Figura 2.1. Tamizado del suelo.



Las unidades de estudio consistieron en terrarios plásticos de 7000 ml que contenían 1 kg de un suelo prístino sin antecedentes de contaminación con xenobióticos los cuales fueron artificialmente contaminados con fenantreno.

Figura 2.2. Terrarios plásticos utilizados.



La contaminación se realizó con una solución acetónica de fenantreno (20 %) y mezclado manualmente con espátula, a fin de lograr una concentración final en el suelo de 2000 ppm. Se seleccionó esta concentración basada en estudios anteriores, siendo la registrada en sitios con signos evidentes de contaminación con PAHs (Ibarrolaza et al. 2005; Carrión et al. 2017). Posteriormente, se aplicaron plántulas de *M. sativa* de 21 días de crecimiento en 3 sistemas de estudio a razón de 1 plántula / 4cm², 150 plántulas en total y se dejó como control otros 3 terrarios sin plantas.

La germinación de las semillas de *M. sativa* se llevó a cabo en germinadores individuales de 10 ml llenos con tierra. A los 21 días de la germinación y emergencia de las plántulas se sembraron en los terrarios correspondientes, Figura 2.2.

2.3.2 Muestreo y análisis de las unidades de estudio

A diferentes tiempos de incubación (7, 14, 21, 28, 42 y 56 días) se tomó una muestra de suelo de cada terrario (50 g) en forma aleatoria correspondiente a una profundidad de 2 cm, para analizar los parámetros que a continuación se detallan.

Se cuantificó el fenantreno residual de los sistemas a través del procedimiento US-EPA 8310. En un aparato Soxhlet se colocó un sobre de papel de filtro conteniendo 25 g de una muestra de suelo mezclada con 25 g de sulfato de sodio anhidro y 200 ml acetato de etilo (Dorwil) como solvente de extracción. Los hidrocarburos fueron extraídos durante 6 horas. La concentración de los extractos en acetato de etilo fue estimada a través de cromatografía líquida de alta presión en fase reversa (HPLC)

utilizando un Cromatógrafo Waters y una columna Symmetry Waters C18 column (15 cm x 4.6 mm de diámetro, tamaño de perlas de 5 mm, tamaño de poro 100 Å) y un detector 2996 photodiode array (WatersR). Los espectros de absorción al UV (250,9 nm) obtenidos se analizaron con el software Empower (US-EPA 2000).

A fin de estudiar un indicador general de la actividad metabólica presente en el suelo se determinó la actividad deshidrogenasa, usualmente se la relaciona también con la densidad celular y los microorganismos viables que poseen la capacidad de oxidar un compuesto. Las enzimas bacterianas implicadas en la degradación aeróbica de los PAH suelen ser monooxigenasas, dioxigenasas y deshidrogenasas (Haritash et al. 2009).

Se determinó la actividad deshidrogenasa a través de estimación de la reducción de tricloruro de 2,3,5-trifenil tetrazolium (TTC) a trifenilformazan, (TPF), siguiendo el protocolo de Thalman (1968). Tres muestras independientes de 5 g de cada sistema fueron analizadas a cada tiempo de muestreo.

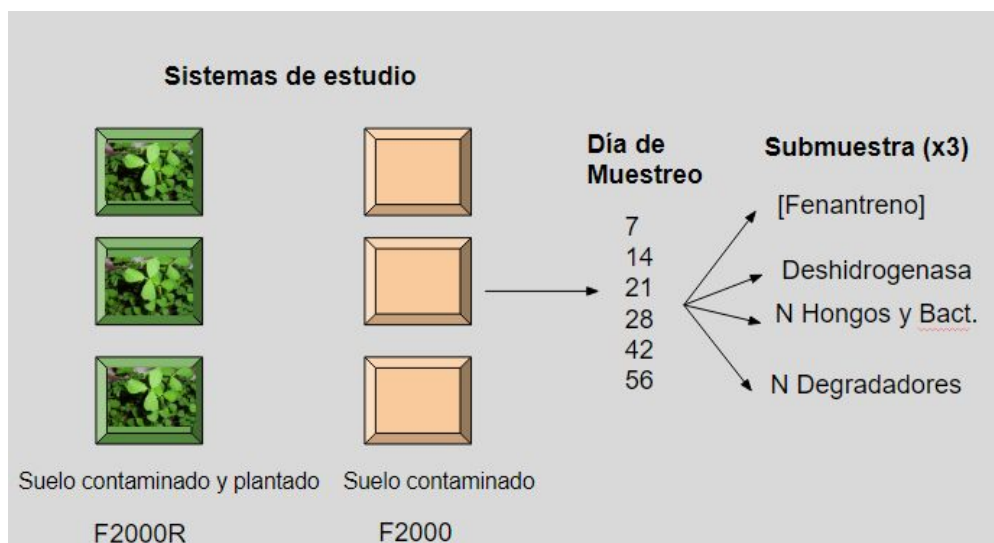
La cuantificación de hongos y bacterias se llevó a cabo siguiendo el protocolo de Reasoner (1985), para ello se tomaron 10 g de suelo de cada sistema de estudio y se resuspendieron en 90 ml de solución fisiológica agitando por 30 min a 150 rpm. A partir del homogenato de suelo se realizaron diluciones seriadas y 100 µl de éstas se aplicaron sobre el medio R2A para el recuento de bacterias heterótrofas cultivables, y sobre el medio RB para el recuento de hongos, la composición de los medios R2A y RB se puede observar en la Tabla 2.1. Las placas fueron incubadas a 20± 2 °C por 10 días. Las colonias desarrolladas fueron contabilizadas con lupa para estimar las unidades formadoras de colonias UFC.

Tabla 2.1. Composición de los medios de cultivo utilizados:

| Medio de cultivo R2A (g/1000ml) | Medio de cultivo RB (g/1000ml) |
|---|---|
| Peptona proteosa 0.5 g Caseína hidrolizada (tryptona) 0,5 g Extracto de levadura 0,5 g D(+) - Glucosa 0,5 g Almidón 0,5 g Piruvato de sodio 0,3 g Dipotasio hidrógeno fosfato 0,3 g Sulfato de Magnesio (anhidro) 0,024 g Agar 15 g | KH ₂ PO ₄ 1 g MgSO ₄ x 7H ₂ O 0,5 g Peptona 5 g Dextrosa 10 g Extracto de levadura 0,5 g Rosa bengala 0,033 g Sulfato de estreptomicina 0,03 g Agar 20 g |

El número de microorganismos degradadores de PAH se cuantificó a través de la técnica del número más probable (NMP), utilizando un medio mineral líquido implementado con una mezcla de PAHs compuesta por fenantreno (0,5 g), antraceno (0,5 g), fluoreno (0,5 g) y dibenzotiofeno (0,5 g) diluidos en 100 ml pentano. Esta dilución se colocó en policubetas de 96 pocillos a razón de 200 ul por cada uno. Se dejó evaporar el pentano y se le agregó 180 ul de medio mineral líquido. En estos pocillos se inoculó 20 ul diferentes diluciones seriadas (1/10) de suelo por octuplicado, que luego de 2 semanas a 20°C, dieron o no una reacción de color (tomada como positivo), producida por la degradación de los PAHs, lo cual fue indicativo de su uso como sustrato por la microbiota asociada al suelo analizado (Wrenn et al. 1996). El resultado se expresó como el NMP de bacterias degradadoras de PAH/g de suelo seco. En la Figura 2.3, se puede observar todo el diseño experimental.

Figura 2.3. Esquema diseño experimental.



2.3.3 Análisis estadístico

El efecto de la aplicación de plantines *M. sativa* sobre la concentración de fenantreno en suelo se evaluó analizando si existían diferencias significativas entre los tratamientos F2000+R (grupo experimental) y F2000 (control) en los valores residuales a lo largo del tiempo. Los resultados del efecto de la aplicación de plantines de *M. sativa* sobre la concentración de fenantreno en suelo, se evaluó a través de un test de ANOVA de medidas repetidas ($P < 0.05$). Previamente se comprobó la normalidad de

los datos con el test Shapiro-Wilk, y se realizó la prueba de esfericidad de la varianza de Mauchly.

De encontrarse diferencias significativas los tratamientos se compararon a posteriori con el Test HSD (*Honestly-significant-difference*) de Tukey, un test de comparaciones múltiples

Se realizaron gráficos como una herramienta visual para analizar el comportamiento de las diferentes variables.

El análisis estadístico se realizó utilizando el Software Estadístico R, versión 3.4.1, y Software Estadístico XLSTAT 2018.

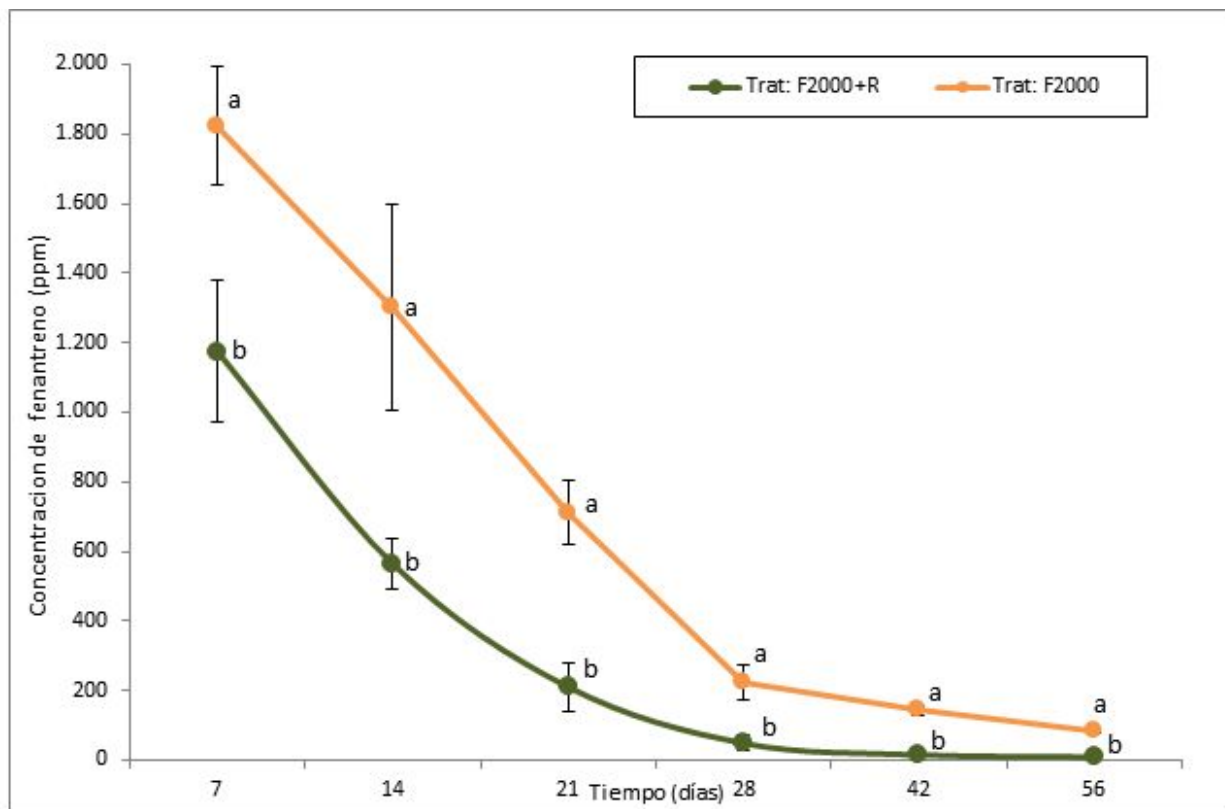
2.4 Resultados

2.4.1 Concentración residual de fenantreno y su cinética de degradación

El sistema F2000R estuvo asociado a una velocidad de degradación superior (Figura 2.4), estadísticamente significativa ($p < 0.05$) hacia el día 7 con un valor promedio de fenantreno de 1181 ppm comparado al sistema control (F2000) de 1798 ppm.

Hacia el final del tratamiento los valores residuales también fueron menores en el sistema F2000R y estadísticamente significativos ($p < 0.05$), con un valor promedio de 9 ppm y 85 ppm para el sistema F2000 respectivamente.

Figura 2.4. Cinética de degradación en los dos sistemas comparados (concentración de fenantreno en el suelo en función del día de tratamiento).



Las barras representan la DS de triplicados. Letras diferentes indican diferencias significativas entre las tasas de degradación a partir de las comparaciones post hoc (Test de Tukey; $P < 0,05$)

El estudio de la cinética de degradación a través del análisis estadístico de ANOVA y posterior test de Tukey arrojó diferencias significativas entre los dos sistemas estudiados durante los 56 días de tratamiento.

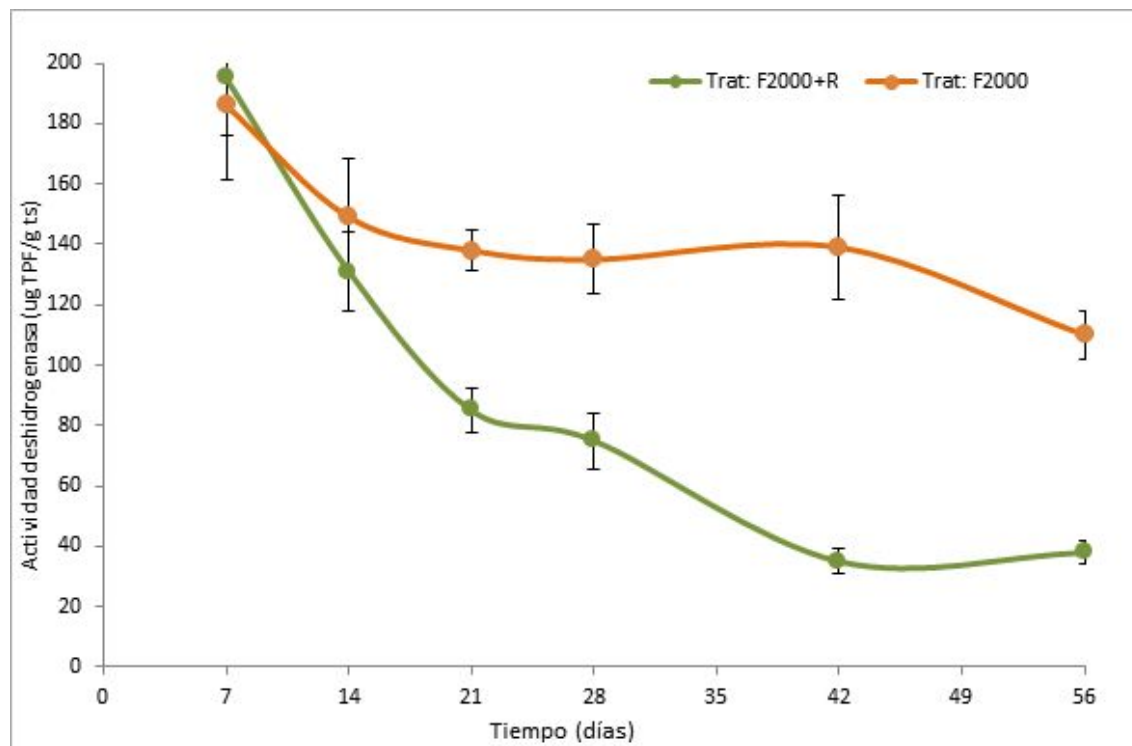
Según estos estudios, los sistemas F2000 y F2000R tienen un comportamiento diferente en cuanto a su cinética de degradación en todas las mediciones realizadas, con un nivel de confianza del 95%. Esta diferencia se corresponde con la mayor velocidad de degradación observada en el sistema F2000R.

2.4.2 Actividad deshidrogenasa como estimador de la actividad microbiana

La actividad deshidrogenasa fue significativamente mayor ($p < 0.05$) en el sistema F2000R sólo el día 7, como puede observarse (figura 2.5), comenzó a descender,

ubicándose en valores significativamente menores ($p < 0.05$) al sistema F2000 durante todo el tratamiento.

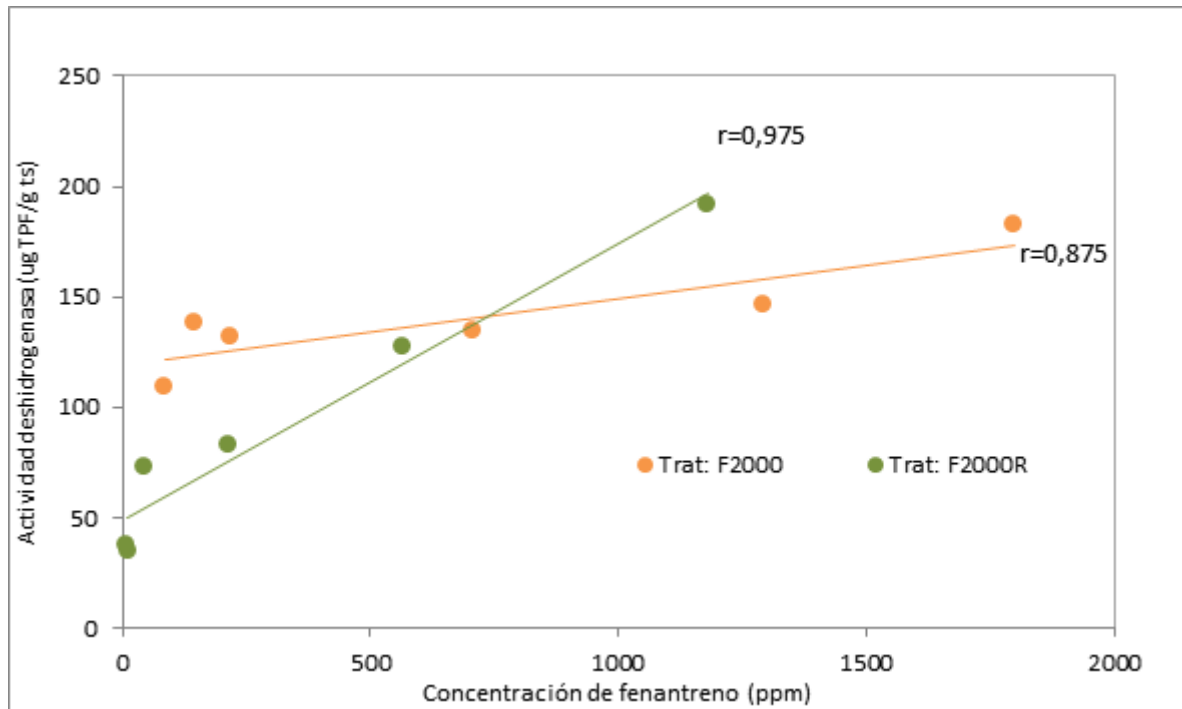
Figura 2.5. Actividad deshidrogenasa en función del tiempo.



Las barras representan la DS de triplicados. TS (tierra seca)

En líneas generales, se observa un descenso de la actividad deshidrogenasa en los sucesivos días de tratamiento en ambos sistemas, el hecho podría corresponderse con el descenso de la concentración de fenantreno. Para evaluar esta relación se estudió la actividad deshidrogenasa en función de la concentración de fenantreno utilizando el Coeficiente de Correlación de Pearson.

Figura 2.6. Correlación de Pearson: Actividad deshidrogenasa en función de la concentración de fenantreno.



Se muestra en el gráfico la actividad deshidrogenasa en función de la concentración de fenantreno

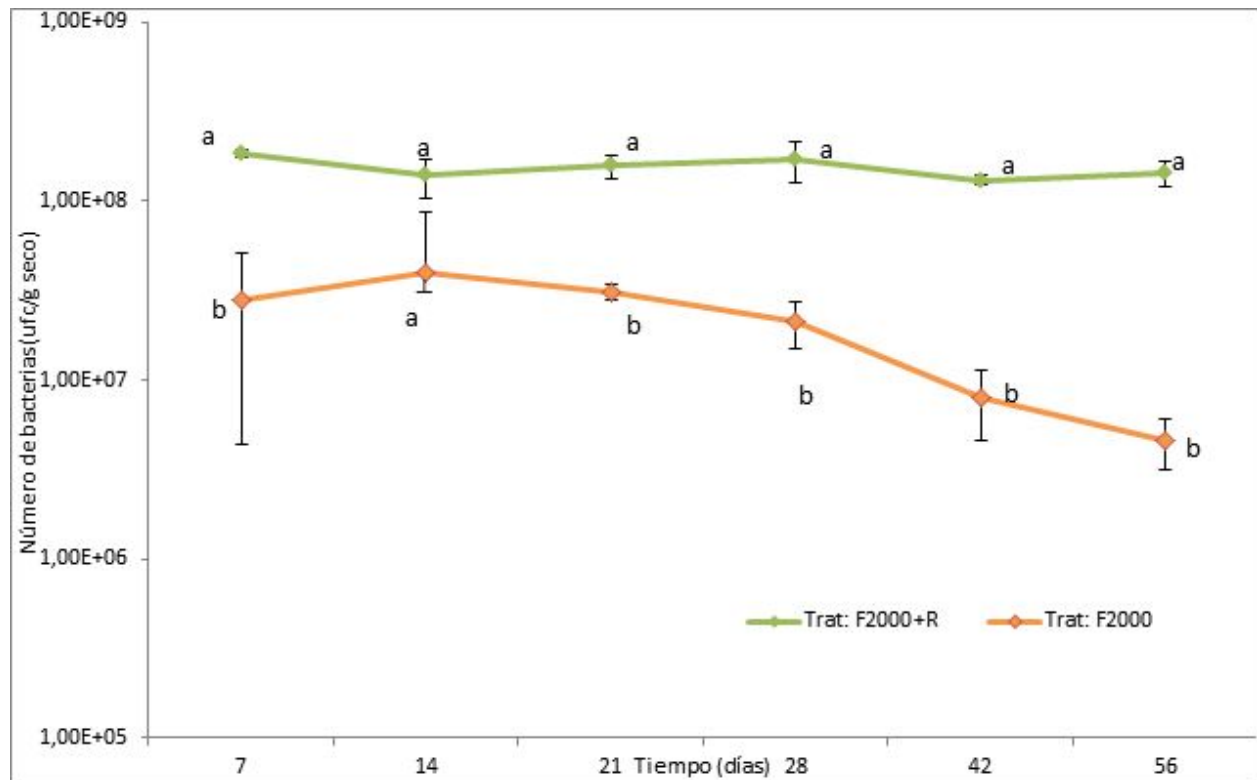
La variable actividad deshidrogenasa disminuyó al igual que la variable concentración de fenantreno, con un Coeficiente de Correlación de Pearson de $r=0.875$, para el sistema F2000 y $r=0.975$ para el sistema F2000R arrojando ambos resultados una correlación positiva entre las dos variables (figura 2.6).

La correlación indica la fuerza y la dirección de una relación lineal y proporcionalidad entre estas dos variables estadísticas. En este caso, se considera que estas dos variables cuantitativas están correlacionadas, ya que los valores de una de ellas varían sistemáticamente con respecto a los valores homónimos de la otra. La correlación entre dos variables no implica, por sí misma, ninguna relación de causalidad.

2.4.3 Número de bacterias heterótrofas y hongos cultivables

Como puede observarse en el gráfico 2.7, las bacterias cultivables en R2A del sistema F2000R se mantuvieron cerca de un orden de magnitud por encima del sistema F2000 durante todo el tratamiento.

Figura 2.7. Número de bacterias heterótrofas cultivables por gramo de suelo durante los días de tratamiento.

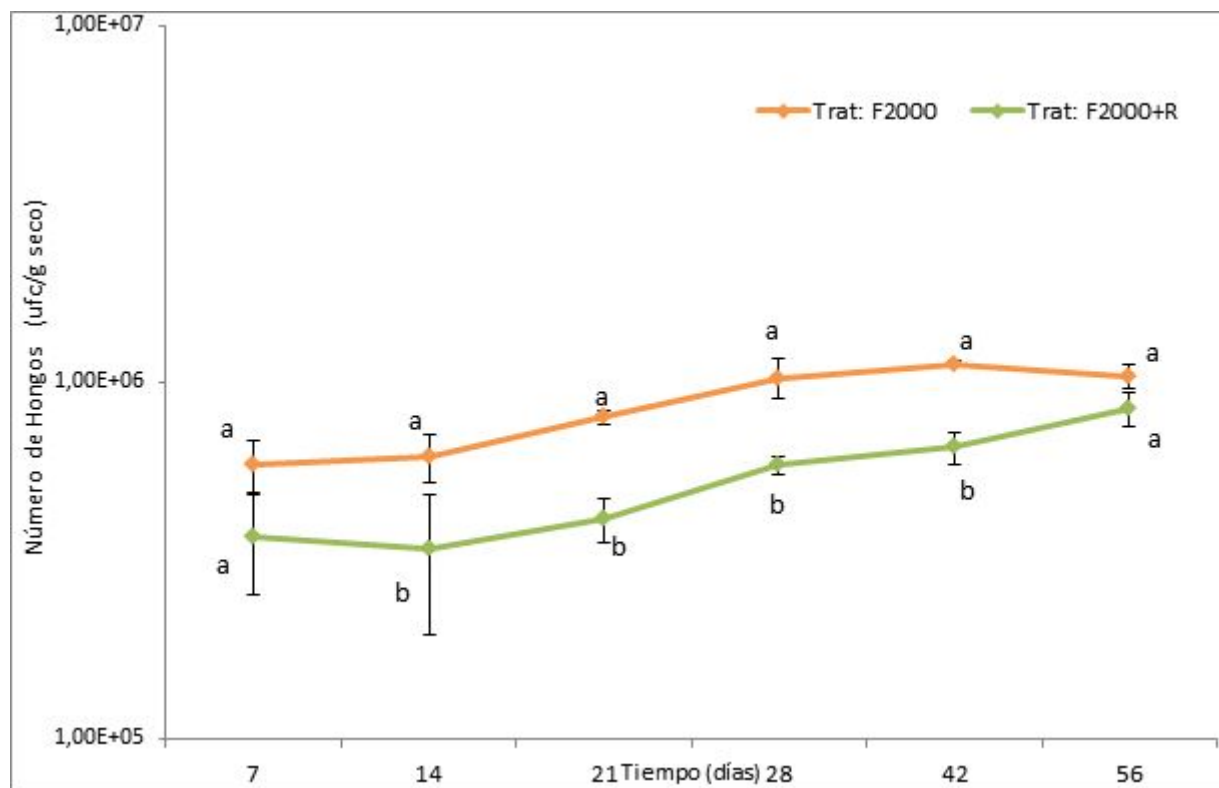


Las barras representan la DS de triplicados. Las diferentes indican diferencias significativas entre el número de bacterias heterótrofas cultivables por gramo de suelo a partir de las comparaciones post hoc (Test de Tukey; $P < 0,05$).

En análisis estadístico realizado para el número de bacterias y hongos de todos los puntos de medición del día 7 al 56 se realizó con ANOVA de medidas repetidas ($p < 0.05$) y posterior test de Tukey arrojaron que existían diferencias significativas en todos los días de tratamiento con excepción del día 14.

En el caso de los hongos no ocurrió lo mismo, sino todo lo contrario. En el sistema rizosférico F2000R, el número de hongos cultivables en RB se mantuvieron por debajo del sistema F2000. Si bien, esta diferencia no llegó a un orden de magnitud, se mantuvo durante todos los días de tratamiento (figura 2.8). Los valores obtenidos se encuentran muy cercanos entre los dos sistemas estudiados, F2000 y F2000R respectivamente.

Figura 2.8. Número de hongos por gramo de suelo durante los días de tratamiento.



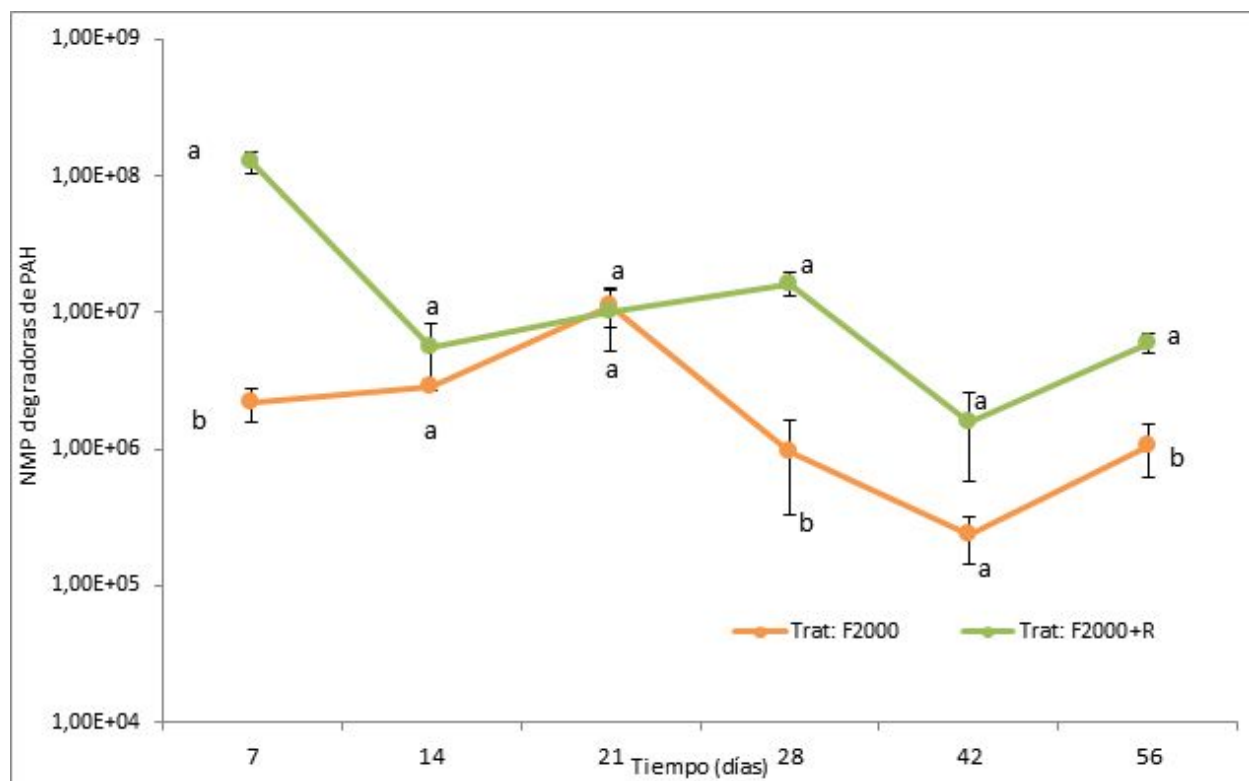
Las barras representan la DS de triplicados. Las diferentes indican diferencias significativas entre el número de hongos por gramo de suelo durante los días de tratamiento. a partir de las comparaciones post hoc (Test de Tukey; $P < 0,05$).

El gráfico 2.8 muestra cómo el número de hongos se mantuvieron inferiores en el sistema F2000R con respecto al sistema F2000 durante todo el tratamiento. A pesar de encontrarse en valores muy próximos, el ANOVA de medidas repetidas ($p < 0.05$) arrojó que existían diferencias significativas en todos los días de tratamiento con excepción del día 7 y 56.

2.4.4 Número de microorganismos degradadores de PAH

De la observación del gráfico NMP/día se deduce que el número de degradadores en los dos sistemas tiene un comportamiento fluctuante, siendo mayor el NMP de degradadores la primera semana de tratamiento, para luego ir decayendo en las sucesivas semanas (figura 2.9)

Figura 2.9. Número de organismos degradadores por gramo de suelo.



Las barras representan la DS de triplicados. Las diferentes indican diferencias significativas entre el número de organismos degradadores por gramo de suelo a partir de las comparaciones post hoc (Test de Tukey; $P < 0,05$).

Luego de este periodo de 14 días, el NMP de degradadores comienza a aumentar hacia el día 28 en el sistema F2000R y permanece por encima del sistema F2000 durante el resto del tratamiento a pesar de las fluctuaciones.

Los resultados de ANOVA de medidas repetidas ($P < 0,05$) y posterior test de Tukey, solo los días 7, 28 y 56 presentan diferencias significativas, mientras que los días 14, 21 y 42 no presentan diferencias significativas.

2.5 Discusión

La concentración residual de fenantreno fue significativamente menor en el sistema plantado F2000R (10 ppm vs. 84 ppm) al igual que la cinética de degradación durante todo el tratamiento, en concordancia con los resultados alcanzados en trabajos anteriores, donde se planteaba el efecto positivo de las plantas en la eliminación de PAH y el hecho de atribuirse principalmente a la mejora de la actividad microbiana general y al aumento de la solubilidad de los PAH a través de exudados radiculares (Cébronnet et al. 2011; Louvel et al. 2011; Thomas y Cebon 2016).

La actividad enzimática relacionada con la degradación de PAH, tuvo un comportamiento diferente, siendo superior solo los primeros días de tratamiento para luego ir bajando y ubicarse por debajo del sistema sin plantas F2000. Este hecho se corresponde con la alta correlación que existe entre la enzima y su sustrato. Al disminuir la concentración del contaminante (PAH) también lo hace la enzima deshidrogenasa.

El número de hongos y bacterias presentan un comportamiento diferente y opuesto según el sistema estudiado. Si comparamos el número de bacterias en el sistema rizosférico (F2000R) es significativamente superior con respecto al sistema F2000, mientras que si comparamos el número de hongos, es el sistema F2000 este presenta los valores más elevados. Este hecho podría atribuirse al efecto de la rizósfera para aumentar la biomasa y la diversidad bacteriana al liberar exudados que modifican la densidad y diversidad dentro de esta zona, dándole una ventaja competitiva a las bacterias en relación a los hongos (D'Orazio et al. 2013; Muratova et al. 2015) y por el contrario inhibir el desarrollo de hongos y seleccionar diferentes bacterias dentro de su influencia (Probanza 2012).

El número de bacterias degradadoras de PAHs posee un comportamiento fluctuante siendo mayor el número en la rizósfera (F2000R). Se desconoce la causa de este comportamiento posiblemente relacionado con la biodisponibilidad de los PAH y la reestructuración de la comunidad degradadora. Diferentes consorcios con otras estrategias podrían utilizar estos PAH poco disponibles como fuente de energía. (Thomas et al. 2017). En los próximos capítulos se podrá aportar más información a este tema cuando se analice en detalle la comunidad microbiana.

Se observó que la aplicación de plántulas de *M. Sativa* contribuye a la remediación de un suelo previamente contaminado con fenantreno. Este sistema plantado mostró que posee significativamente mayor capacidad degradadora, una actividad enzimática superior y un número más elevado de bacterias.

Capítulo 3

Estructura y dinámica de las comunidades bacterianas del suelo a lo largo del proceso de fitorremediación

3.1 Introducción

La estructura de una comunidad puede describirse mediante su riqueza y su diversidad (Miller et al. 2009).

La diversidad es una medida de la complejidad de una comunidad, una función tanto del número de especies diferentes (riqueza de especies) como de sus abundancias relativas (uniformidad de especies). Un mayor número de especies y una abundancia más uniforme de las mismas resultan en una mayor diversidad (Purves et al. 2003).

Existen varias causas por las cuales la estructura de la comunidad del suelo puede cambiar. En el presente capítulo nos enfocaremos en aquellas que consideramos se verán afectadas por nuestro objeto de estudio: la perturbación que causa un contaminante xenobiótico (Chen et al. 2014) y la influencia de las raíces en la zona de la rizósfera (Shi et al. 2011; Liu et al. 2017).

Cuando el suelo es contaminado la perturbación origina un cambio en la estructura de una comunidad (Isabelle et al. 2005; Chen et al. 2014). El proceso de cambio de la composición y estructura de las comunidades biológicas a lo largo del tiempo es lo que se conoce como sucesión ecológica (Walker y del Moral 2003). Estos procesos pueden iniciarse con la colonización de hábitats recientemente formados o con la recolonización de otros que se han visto afectados por una perturbación como en el caso de suelos contaminados (Young et al. 2001; Walker y del Moral 2003). Los cambios que se producen en las comunidades biológicas desde la colonización inicial, y a lo largo del proceso sucesional, comprenden variaciones tanto en su composición taxonómica como en la diversidad de las mismas (Walker y del Moral 2003; Pickett et al. 2005; Hobbs et al. 2007).

Recientemente se ha demostrado que a lo largo de la sucesión ecológica las comunidades microbianas de un hábitat determinado, independientemente del ambiente que se estudien, evolucionan siguiendo el mismo patrón natural el cual puede definirse y predecirse. Por lo tanto, se puede inferir que la sucesión en comunidades microbianas es un proceso orientado y predecible. Estos patrones de desarrollo de la comunidad tienen un marco de tiempo mucho más corto (semanas o meses) que el que

se requeriría para rastrear los patrones de sucesión primaria en las comunidades de plantas o animales, siendo una gran ventaja para su estudio (Ortiz Álvarez et al. 2018).

Durante el proceso de fitorremediación las condiciones del suelo y la rizósfera van cambiando en el tiempo debido a la disminución de la concentración del PAH, disminuyendo la posibilidad de las bacterias para ser utilizado como fuente de carbono (Wei et al. 2014).

Varios estudios han demostrado que las plantas a través de sus exudados radiculares estimulan y producen cambios en la estructura de la comunidad del suelo aumentando el número de individuos y su diversidad, promoviendo a la vez el metabolismo de los PAH en la zona de influencia de las raíces en suelos contaminados (Smalla et al. 2001; Siciliano et al. 2003; Badri et al. 2008; Thomas et al. 2013).

Según lo expuesto, cabría esperar a lo largo del proceso de remediación una estructura de la comunidad diferente en la rizósfera una modificación de la estructura a medida que las condiciones van cambiando.

En el presente capítulo se estudiará la variación de la estructura de la comunidad a lo largo del tiempo durante el proceso de fitorremediación con relación a una situación control de un suelo contaminado sin plantar.

3.2 Objetivo

Estudiar las comunidades microbianas de un suelo artificialmente contaminado con fenantreno e implantado con *M. sativa* y sus variaciones a lo largo del proceso de fitorremediación.

3.3 Material y métodos

Sobre las muestras tomadas en el capítulo 2, se analizaron las comunidades microbianas de los terrarios contaminados con fenantreno en la presencia de *M. sativa* y sistema de suelo control, mediante la técnica de PCR-DGGE en base a la amplificación de los genes rRNA 16S de la comunidad y su separación vía electroforesis desnaturante, considerando cada banda de DGGE como una unidad taxonómica operativa "OTU" (Heuer et al. 2001; Canals 2005). Las comunidades bacterianas se caracterizaron a través de índices de diversidad de Shannon y Weaver (Magurran 2013), curvas de rarefacción y de análisis multivariados (Análisis de componentes principales y Análisis de Correspondencia Canónica, entre otros, Digby &

Kempton 1987) utilizando los softwares Gel Analyzer 2010, XLStat 2018 Ecology, EstimateS y Estadística R.

3.3.1 Extracción de ADN total

El ADN total de las muestras de suelo fue extraído y purificado a partir de un gramo de suelo. Las extracciones se realizaron a partir de las muestras obtenidas de los terrarios F2000R y F2000 a los 7, 14, 21, 28, 42 y 56 días de tratamiento utilizando el Kit comercial E. N. ATM Soil DNA (Omega Bio-tek, Norcross, GA, USA) siguiendo el protocolo del fabricante Omega Bio-tek.

3.3.2 Amplificación del segmento gen 16S rRNA mediante reacción en cadena de la polimerasa: PCR (*polymerase chain reaction*)

Una vez extraídas las muestras de suelo, se amplificó una porción conservada del gen 16S rRNA utilizando el protocolo de PCR (Mullis et al.1986)

Los amplicones del gen 16S rRNA completo de las cepas fueron obtenidos utilizando los primers 27 *forward primer* (50-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-30) y 1492 *reverse primer* (50TACGGCTACCTTACGACTT-30) en un volumen final de reacción de 30 µl. Se utilizó la enzima GoTaq ADN polimerasa (Promega, Madison, WI). El programa de la reacción en cadena de la polimerasa (*PCR*) consistió en una desnaturalización inicial a 95°C por 2 min, seguida de 30 ciclos de 95°C por 30 s, 72°C por 35 s, y el paso de extensión final que se realizó a 72°C por 5 min. El termociclador utilizado fue Eppendorf Mastercycler thermocycler (Eppendorf, Hamburg, Germany).

3.3.3 Separación de los Amplicones utilizando un gel de gradiente desnaturalizante: DGGE (*Denaturing gradient gel electrophoresis*)

Los productos de PCR fueron sembrados en geles de 6% de poliacrilamida utilizando un gradiente desnaturalizante 40-70% (DGGE)

La electroforesis se realizó en buffer TAE 1X en un DGGE-2401 apparatus (C.B.S Scientific Co., Del mar, CA, USA) a una temperatura de 60°C. Se aplicó un voltaje constante de 100 V durante 16 h para la corrida. Luego de la electroforesis, el gel se tiñó durante una hora con SybrGold® (Invitrogen) a fin de evidenciar los resultados obtenidos.

El gel fue observado por trans-iluminación con luz UV y digitalizado en una cámara-CCD, guardado como archivo.png, para luego ser analizado utilizando el software de análisis Gel Analyzer 2010.

El estudio de la comunidad bacteriana se realizó a través de los distintos índices en base a las matrices obtenidas a partir de los patrones de bandas proporcionado por el software de análisis Gel Analyzer 2010, siendo la posición cada banda considerada como una OTU y su intensidad utilizada como una estimación del el número de individuos de la OTU correspondiente.

3.3.4 Análisis de la comunidad bacteriana

3.3.4.1 Cálculo de índice de Shannon

Índice de *Shannon y Weaver* (Shannon y Weaver, 1949), H' . Este índice se basa en la teoría de la información (mide el contenido de información por símbolo de un mensaje compuesto por S clases de símbolos discretos cuyas probabilidades de ocurrencia son $p_1 \dots p_S$) utilizándose en forma frecuente en estudios de ecología de comunidades:

$$H' = - \sum_{i=1}^S (p_i \times \log_2 p_i)$$

H' = índice de *Shannon y Weaver* que en un contexto ecológico, como índice de diversidad, mide el contenido de información por individuo en muestras obtenidas al azar provenientes de una comunidad 'extensa' de la que se conoce el número total de especies S . También puede considerarse a la diversidad como una medida de la incertidumbre para predecir a qué especie pertenecerá un individuo elegido al azar de una muestra de S especies y N individuos. Por lo tanto, H' es igual a 0 cuando la muestra tiene solo una especie, y la H' es máxima cuando todas las especies S están representadas por un mismo número de individuos n_i , es decir, que la comunidad tenga una distribución de abundancias perfectamente equitativa.

La ecuación de H' se aplica para comunidades extensas donde se conocen todas las especies S y las abundancias proporcionales p_i de todas ellas. En la práctica los parámetros son estimados como:

$$\hat{H}' = - \sum_{i=1}^S \left[\left(\frac{n_i}{n} \right) \times \log_2 \left(\frac{n_i}{n} \right) \right]$$

Dónde:

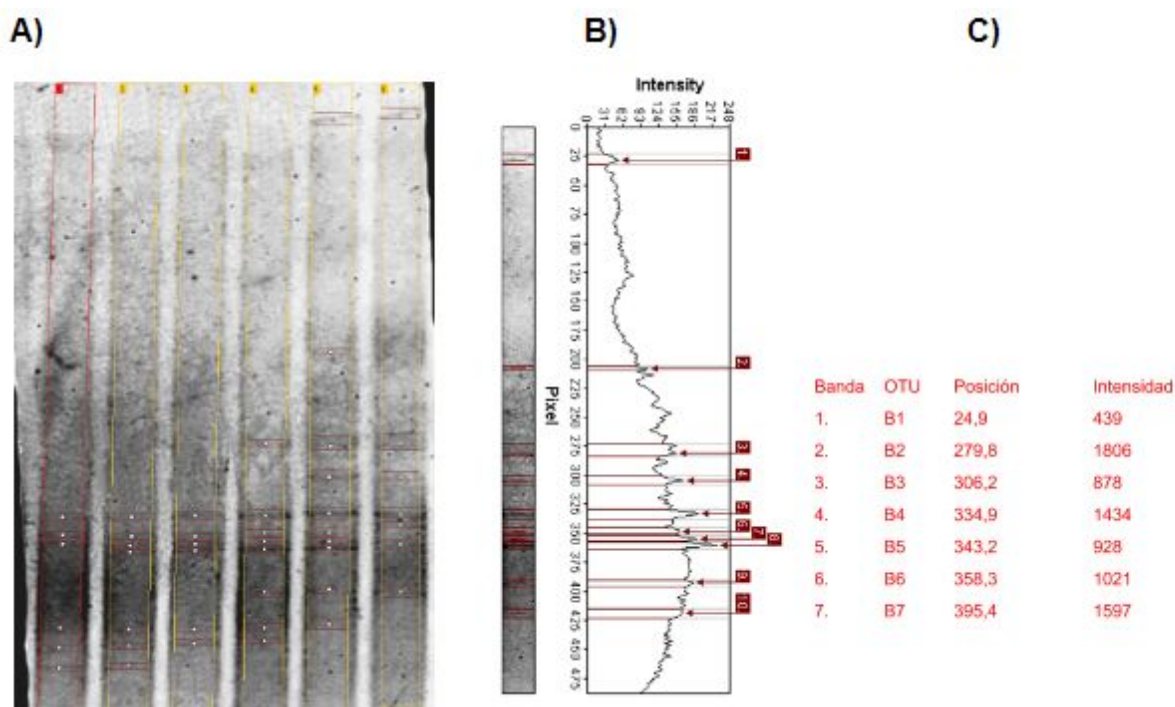
S= Número de especies

n_i = Número de individuos de la especie i

n= Número total de individuos

Los datos obtenidos del perfil de bandas a través del *Software Gel Analyzer* 2010 fueron utilizados para calcular los índices de diversidad de Shannon. Cada banda fue considerada una especie (i) y la intensidad relativa de cada banda como su abundancia (n_i). La suma del área de la totalidad de los picos de la curva densitométrica fue considerada como el número total de individuos de la comunidad (n) (Fromin et al. 2002).

Figura 3.1 Procedimiento para el análisis de geles utilizando el *Gel Analyzer* 2010



En la siguiente figura se observa la metodología utilizada, A) gel Sistema F2000. B) Análisis densitométrico de las bandas. C) matriz de datos obtenida.

Para obtener una matriz de OTUs el programa Gel Analyzer 2010 detecta automáticamente las bandas por diferencia de contraste y las marca para luego ser analizadas. En la imagen se observa como bandas delimitadas con un punto en el centro. Luego de identificar las bandas el programa toma cada calle (días 7, 14, 21, etc) y las analiza individualmente para realizar un gráfico de ubicación e intensidad cromática. La intensidad relativa de cada banda, se expresa como un pico con una altura determinada en una curva densitométrica, que se relaciona con el número de individuos (n_i), y se define como el área bajo la curva densitométrica de cada pico formado en el gráfico. (Fromin et al. 2002). Una vez obtenido el gráfico el programa Gel Analyzer 2010 realiza la matriz e identifica las OTU y abundancia en base a su intensidad. (Figura 3.1)

Los datos fueron procesados con el Software Estadístico R, utilizando *BiodiversityR* un complemento del R commander para cálculos de diversidad. Este complemento agrega un nuevo menú al R Commander con el que se pueden hacer varios análisis vinculados a la biodiversidad.

3.3.4.2 Curvas de rarefacción

Un problema teórico frecuente en ecología de comunidades es no poder hacer una comparación objetiva de la riqueza de especies hasta que las diferencias en tamaño muestral sean minimizadas. La estandarización por medio del método de rarefacción basada en individuos, permite una comparación más apropiada cuando los únicos datos disponibles son listados de especies y sus abundancias (Kraker et al. 2011).

La rarefacción es un método que fue propuesto para comparar el número de especies cuando las muestras difieren en tamaño (Gotelli y Colwell 2011), estima a la riqueza de especies en función del tamaño de muestra más pequeño.

El método de rarefacción basado en individuos estima el número medio de especies a través de sub-muestras repetidas al azar de n^* individuos a partir de la muestra original más grande, siendo $n^* = n$ el tamaño de la muestra original más pequeña (Gotelli y Colwell 2011). Este mismo procedimiento permite estimar la varianza de S^* entre reordenamientos al azar de los individuos y la prueba de hipótesis consiste en preguntarse si S (la riqueza observada completa de la muestra más

pequeña), se ubica dentro del intervalo de confianza de 95% de S^* (la riqueza de especies esperada basada en las sub-muestras al azar de tamaño n); si el valor observado cae dentro del intervalo de confianza, entonces la hipótesis de que la riqueza de la muestra más pequeña basada en todos los individuos n no difiere de la riqueza de una sub-muestra de tamaño n^* , no puede ser rechazada a $p < 0.05$ (Gotelli y Colwell 2011). La rarefacción también permite construir una curva entera en la cual el número de individuos sub-muestreados al azar se encuentran en un rango que va de 1 a N (Gotelli y Colwell 2011). Los valores de riqueza promedio en base a la curva de rarefacción (curva suavizada) se calcularon utilizando el programa libre EstimateS (Versión 9.1.0), Copyright R. K. Colwell.

3.2.4.3 Análisis multivariados (Análisis de componentes principales y Análisis de Correspondencia Canónica)

Con el objeto de comprender qué variables condicionan la estructura de datos de las comunidades en cada sistema se realizaron análisis multivariados.

El análisis multivariado es el nombre genérico que se da a un conjunto de técnicas que permiten estudiar simultáneamente muchas variables que influyen en un gran número de individuos. Se emplea para reducir a dimensiones tangibles un cúmulo de información y detectar las variables que estarían condicionando la estructura de los datos estudiados. En realidad lo que se hace es “aplastar” una nube multidimensional de puntos para llevarla a dos dimensiones. Como los dos componentes principales deben ser ortogonales, puede haber una relación cuadrática entre ellos y se acortan las distancias entre los puntos extremos (Lozada 2010).

El Análisis de Componentes Principales (ACP), es un modelo lineal multivariante. Considera que las relaciones entre las variables y entre éstas y los individuos son de tipo lineal. El ACP es exitoso cuando el gradiente estudiado es corto, ya que en este caso las relaciones entre las especies y entre éstas y el medio ambiente pueden expresarse de manera lineal.

El Análisis Canónico de Correspondencia (ACC) es una técnica desarrollada para relacionar directamente la composición de las comunidades con variaciones ambientales. Detecta patrones de variación en la composición de las comunidades que son explicados por variables ambientales.

Se utilizó el software XLStat 2018 Ecology para el análisis multivariado de los datos obtenidos a partir de los geles.

3.4 Resultados

3.4.1 Análisis de los geles obtenidos por PCR-DGGE

Se observó un mayor número de bandas en el sistema F2000R, en total 114 bandas en relación al sistema F2000 donde se contabilizaron 46 bandas en total.

En los sucesivos días de medición el sistema F2000 se mantuvo estable en cuanto al número de bandas (7 bandas los primeros días de tratamiento y 6 bandas al finalizar). sin embargo el sistema F2000R tuvo un comportamiento completamente diferente, se observaron pocas bandas los primeros días de tratamiento (5 bandas) para luego ir aumentando los sucesivos días de tratamiento hasta llegar a un máximo de 34 bandas el día 42, para finalizar el día 56 con 26 bandas.

En la figura 3.2 puede observarse ambos geles y la distribución de bandas a lo largo de los sucesivos días de tratamiento.

Luego de identificar las OTUs utilizando el *Gel Analyzer 2010* y seguir en el tiempo del tratamiento la aparición y extinción de las mismas, se observó una sucesión ecológica en ambos sistemas. Una sucesión ecológica se define como un proceso ordenado de autoorganización de un sistema complejo con ciertos niveles de homeostasis (Zhou et al. 2014), caracterizado por un cambio unidireccional, secuencial en la dominancia relativa de especies de una comunidad (Sahney et al. 2008). Según esta definición podemos explicar la aparición / extinción de grupos de OTUs en el tiempo.

Las etapas se pueden categorizar en:

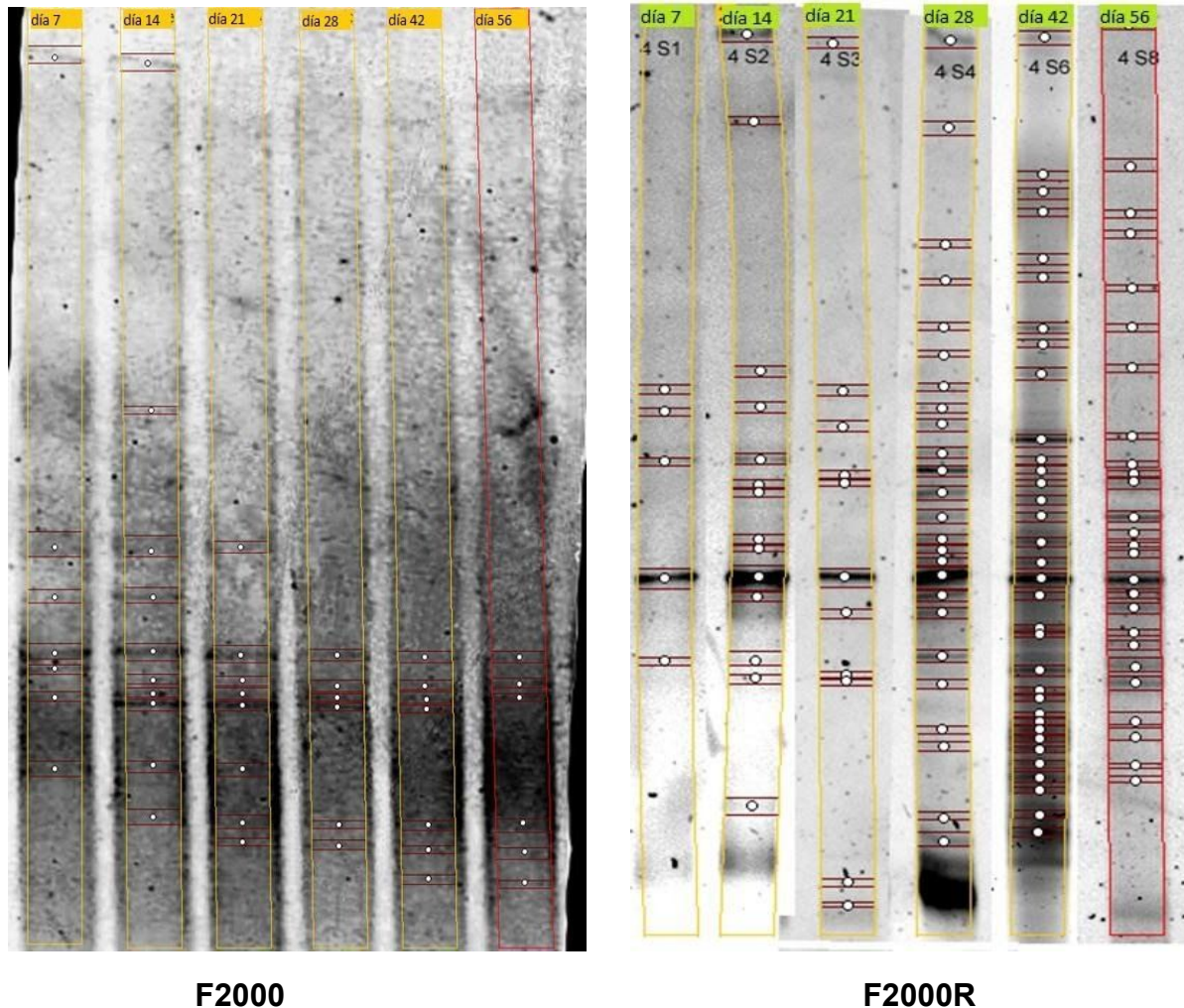
- Etapas iniciales o de constitución, dominadas por especies que en el lenguaje ecológico se llaman pioneras u oportunistas.

- Etapas intermedias, o de maduración.

- Etapas finales, que concluyen cuando se alcanza el clímax o madurez del sistema.

Caracterizada por especies especialistas y eficientes, en cuanto al uso de recursos. (Fierer et al. 2010)

Figura 3.2. Análisis de geles de los sistemas no plantados (F2000) y plantados (F2000R).



En esta figura se observa el perfil de bandas correspondientes al sistema F2000 y F2000R en los diferentes días de incubación analizados por el software *Gel Analyzer 2010*.

Si observamos la tabla 3.1, a partir del día 7, donde el contaminante fenantreno causa la perturbación en la comunidad, y hacia el día 56, donde los niveles de contaminación son mínimos, diferentes grupos de OTUs van dominando y desapareciendo para terminar en un clímax hacia el final donde se establece un equilibrio.

Tabla 3.1. Dinámica de la comunidad en los sucesivos días de tratamiento.

F2000

| Día | 7 | 14 | 21 | 28 | 42 | 56 |
|--------------------|---------------|-----------------------|--------------------|-------------------|----------------------|-------------------|
| Bandas detectadas | 7 | 10 | 8 | 7 | 8 | 6 |
| OTUs identificadas | 1,2,3,4,5,6,7 | 1,2,3,4,6,7,8,9,10,11 | 2,4,6,7,9,10,11,12 | 4,6,9,10,11,12,13 | 4,6,9,10,11,12,13,14 | 4,6,9,11,12,14 |
| OTUs extintas | - | 5 | 1,3,8 | 2,7 | - | 10,13 |
| Acumulado | - | 5 | 1,3,5,8 | 1,2,3,5,7,8 | 1,2,3,5,7,8 | 1,2,3,5,7,8,10,13 |

F2000R

| Día | 7 | 14 | 21 | 28 | 42 | 56 |
|--------------------|-----------|-----------------------------------|----------------------------|--|---|--|
| Bandas detectadas | 5 | 14 | 11 | 23 | 34 | 26 |
| OTUs Identificadas | 1,2,3,4,5 | 2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15 | 4,6,9,14,16,17,18,19,20,21 | 4,6,14,16,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,31,32,33,34,35,36,37,38,39 | 4,6,23,24,27,28,29,30,31,33,34,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54,55,56,57,58 | 4,6,24,27,28,30,31,33,34,37,42,45,46,47,49,50,51,52,56,57,59,60,61,62,63,64 |
| OTUs extintas | - | 1 | 2,3,5,7,8,10,11,12,13,15 | 9,17,18,19,20 | 14,16,21,22,25,26,32,35 | 23,29,36,38,39,40,41,43,44,48,53,54,55,58 |
| Acumulado | - | 1 | 1,2,3,5,7,8,10,11,12,13,15 | 1,2,3,5,7,8,9,10,11,12,13,15,17,18,19,20 | 1,2,3,5,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,25,26,32,35 | 1,2,3,5,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,25,26,29,32,35,36,38,39,40,41,43,44,48,53,54,55,58 |

En la siguiente tabla se observa la dinámica de la comunidad en los sucesivos días de tratamiento. En verde la aparición de nuevas OTUs. En rojo la extinción de OTUs. El total acumulado especifica las OTUs extintas desde el inicio del tratamiento hasta el día de medición. Las OTUs se identificaron utilizando el *Gel Analyzer 2010*.

Diferentes grupos de OTUs van apareciendo a lo largo de las semanas, esto se hace más evidente el sistema F2000R el cual posee mayor riqueza. En este sistema, las OTUs pioneras-oportunistas 1, 2, 3, 5 y 7 dominan la comunidad para ir

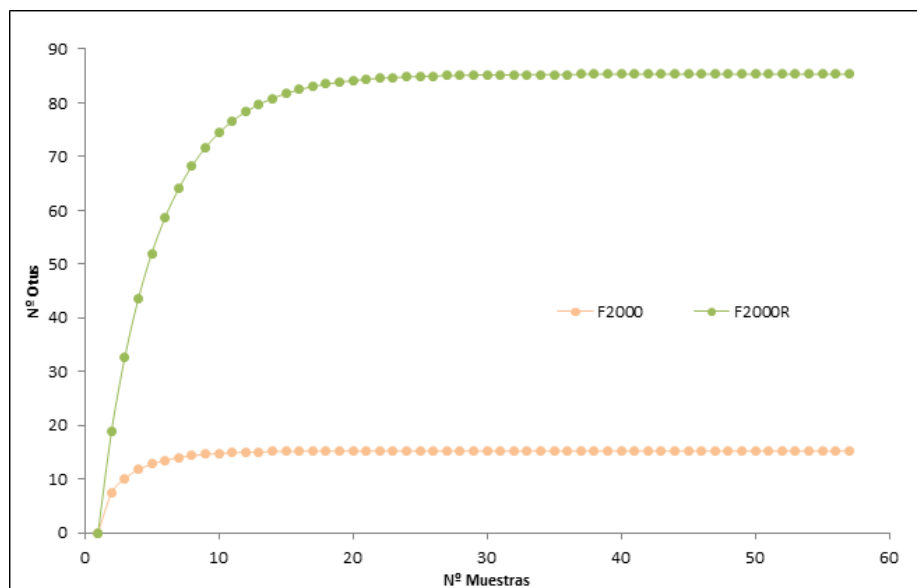
desapareciendo en los sucesivos días de tratamiento, donde son reemplazadas por otras OTUs (8, 9, 10, 11, 12, 13 y 14), las cuales a su vez son reemplazadas por otras (22, 23, 24 y 25) más lentamente, hasta llegar a una madurez o máxima complejidad, el punto de equilibrio donde la riqueza no aumenta. Las OTUs 4 y 6 permanecen todo el tratamiento en el sistema plantado F2000R.

Si bien el proceso de sucesión es difuso y es complicado establecer el límite de cada etapa, está clara la sustitución de unas OTUs por otras en los sistemas F2000 y F2000R.

3.4.2 Estructura comunitaria bacteriana

La riqueza calculada a través de las curvas de rarefacción ($p = 0.05$) fue mayor en el sistema F2000R ($86.85 \text{ OTUs} \pm 9.11$) comparada al sistema F2000 ($16.35 \text{ OTUs} \pm 2.01$). En el gráfico (Figura 3.3) se observa la diferencia significativa entre los dos sistemas.

Figura 3.3 curvas de rarefacción sistemas F2000 y F2000R



En el gráfico se observa las curvas de rarefacción de los sistemas F2000 y F2000R, El sistema plantado presentó el mayor número de OTUs.

La diversidad de los sistemas F2000 y F2000R presentó un comportamiento diferente a lo largo del tiempo. El sistema F2000R aumentó gradualmente con el día de tratamiento (coeficiente de correlación $R=0.82$), mientras que el sistema F2000 tuvo una leve fluctuación en el tiempo, no relacionado con el día de tratamiento (coeficiente de correlación $R = -0.43$). El sistema F2000 presentó mayores índices de diversidad a 7

días de tratamiento ($H'=1,82$) con respecto al sistema F2000R ($H'=1,41$). Sin embargo, a partir del día 21 la diversidad H' del sistema F2000R comienza aumentar superando al sistema F2000, con valores finales a los 56 días de $H'=1,69$ para el sistema no plantado F2000 y $H'=3,25$ para el sistema F2000R. (Gráfico 3.4)

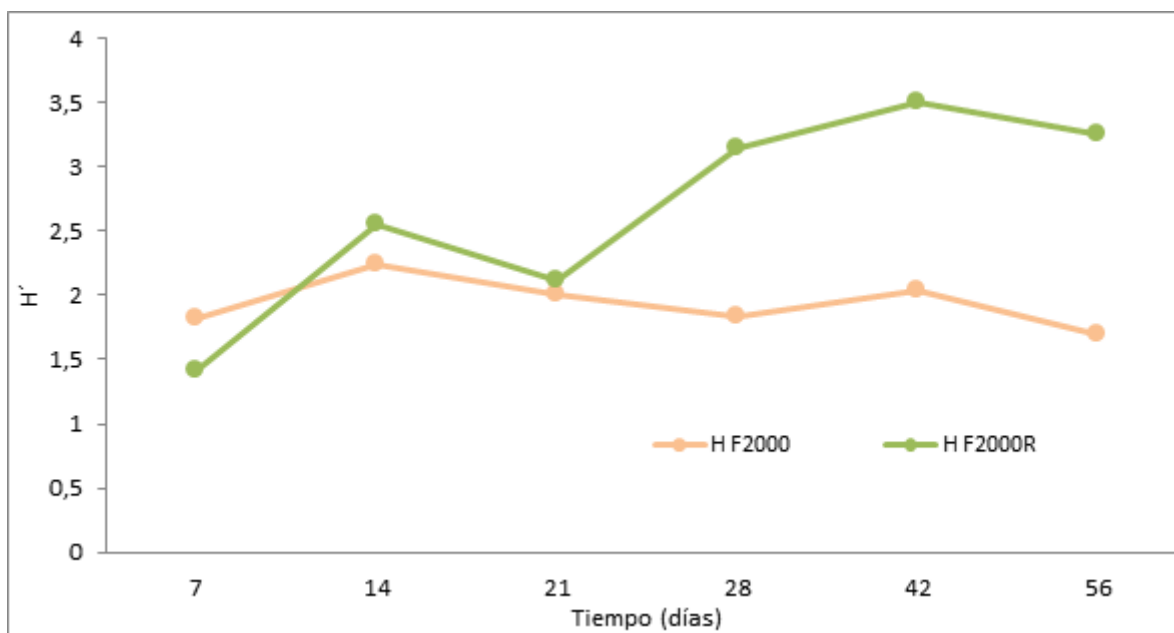
En la Tabla 3.2 se pueden observar todos los valores calculados para los sistemas F2000 y F2000R utilizando *BiodiversityR*.

Tabla 3.2 Cálculo del índice de diversidad de los sistemas F2000 y F2000R (*BiodiversityR*)

| Ind Div Día/ Sist. | Shannon index H' | |
|-----------------------|--------------------|--------|
| | F2000 | F2000R |
| Día 7 | 1,82 | 1,41 |
| Día 14 | 2,24 | 2,56 |
| Día 21 | 2,01 | 2,11 |
| Día 28 | 1,84 | 3,15 |
| Día 42 | 2,04 | 3,51 |
| Día 56 | 1,69 | 3,25 |

En la siguiente tabla se expresan los diferentes índices de diversidad calculados con *BiodiversityR*.

Figura 3.4 Variación de la diversidad H' en función del día de tratamiento



Variación de la diversidad H' en función del tiempo. Se observa un comportamiento diferente, el sistema F2000 fluctúa a lo largo del tiempo y el sistema F2000R fluctúa y aumenta.

3.3.4 Análisis multivariados

3.3.4.1 Análisis de componentes principales

Se utilizó el ACP para determinar que variables explicativas en su análisis pueden correlacionarse entre sí e identificar el componente de su conjunto de datos que maximiza la varianza y a su vez determinar posibles grupos relacionados.

En la tabla 3.6 se presentan las variables y los sistemas de estudio.

En la matriz de correlaciones ($p = 0.05$) (Tabla 3.7) podemos observar las variables relacionadas, diversidad con riqueza (0.97) y actividad deshidrogenasa con concentración de fenantreno (0.79).

Estos dos grupos de variables representan el 83.1% de la variabilidad total de los datos (tabla 3.8), lo cual nos asegura que los mapas a partir de los dos primeros factores son una proyección de buena calidad de la tabla multidimensional inicial.

Actividad deshidrogenasa posee una correlación negativa con diversidad y riqueza (-0.85 y -0.84).

Tabla 3.6 Matriz de datos ACP

| Sistemas | H' | Riqueza | BUFC | HUFC | Degr. | C FE | Act. DesH |
|------------|------|---------|-----------|---------|-----------|------|-----------|
| F2000(7) | 1,82 | 7 | 26836729 | 615344 | 2365431 | 1821 | 189 |
| F2000(14) | 2,24 | 10 | 77425681 | 644762 | 2657632 | 1302 | 151 |
| F2000(21) | 2,01 | 8 | 30249772 | 763851 | 11300261 | 711 | 132 |
| F2000(28) | 1,84 | 7 | 22570159 | 985374 | 710155 | 225 | 136 |
| F2000(42) | 2,04 | 8 | 8545064 | 1132169 | 229157 | 144 | 137 |
| F2000(56) | 1,69 | 6 | 4453654 | 956132 | 1150896 | 85 | 111 |
| F2000R(7) | 1,41 | 5 | 195487982 | 436585 | 109921926 | 1175 | 195 |
| F2000R(14) | 2,56 | 14 | 148469787 | 340376 | 4071963 | 564 | 125 |
| F2000R(21) | 2,11 | 10 | 148936897 | 500144 | 11275719 | 210 | 84 |
| F2000R(28) | 3,15 | 25 | 169106923 | 606664 | 18005872 | 48 | 74 |
| F2000R(42) | 3,51 | 34 | 127184187 | 756139 | 1691973 | 15 | 31 |
| F2000R(56) | 3,25 | 26 | 151602402 | 852541 | 5990239 | 9 | 36 |

* Estructura de la Matriz: Observaciones/Variables. Abreviaturas: BUFC: Bacterias unidades formadoras de colonias por gramo de tierra seca. HUFC: Hongos unidades formadoras de colonias por gramo de tierra seca. Degr: Número más probable bacterias degradadoras por gramo de tierra seca. C FE: concentración de fenantreno ppm. Act. DesH: Actividad deshidrogenasa

Tabla 3.7 Matriz de correlaciones ACP (Pearson)

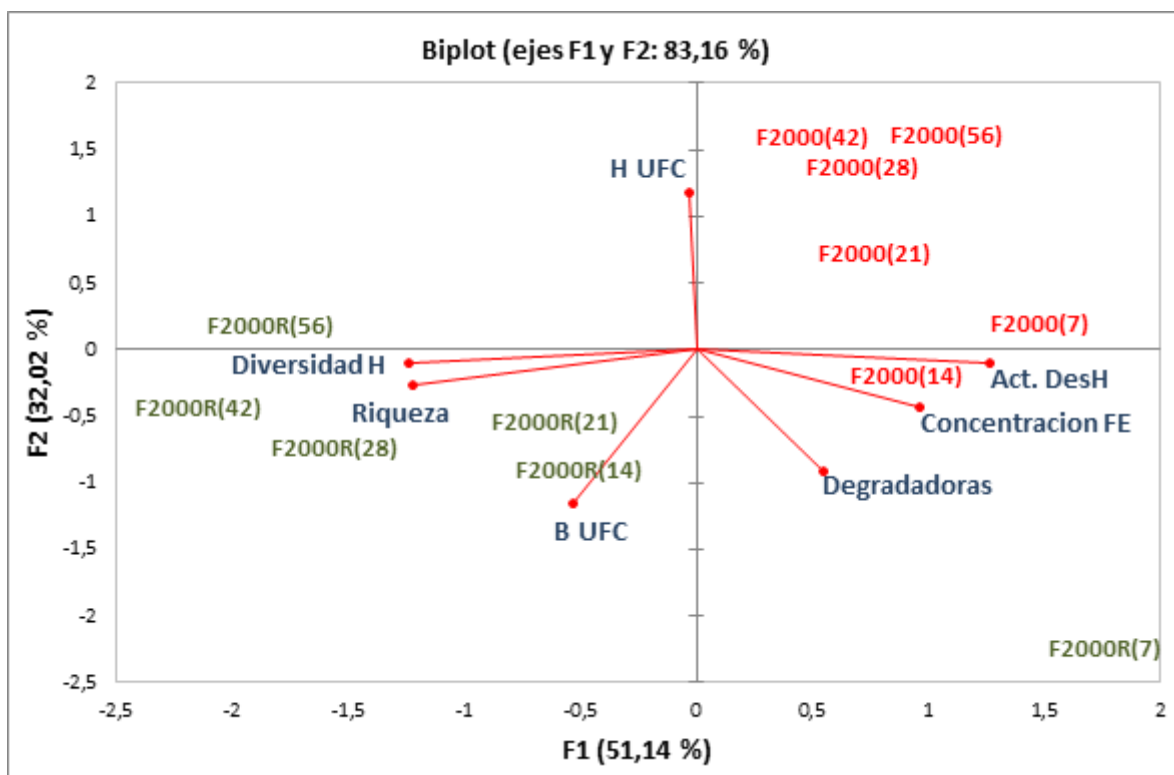
| Variables | H' | Riqueza | BUFC | HUFC | Degra | C FE | Act. DesH |
|-----------|----|---------|------|-------|-------|-------|-----------|
| Div. H' | 1 | 0,97 | 0,40 | -0,08 | -0,42 | -0,50 | -0,85 |
| Riqueza | | 1 | 0,50 | -0,14 | -0,23 | -0,49 | -0,84 |
| BUFC | | | 1 | -0,75 | 0,49 | -0,11 | -0,34 |
| HUFC | | | | 1 | -0,40 | -0,41 | -0,09 |
| Degra | | | | | 1 | 0,31 | 0,42 |
| C FE | | | | | | 1 | 0,79 |
| Act. DesH | | | | | | | 1 |

El ACP con los ejes F1 y F2 (tabla 3.8) representó el 83.16% de la varianza. En el mapa biplot (Figura 3.5) se observa el eje horizontal relacionado con riqueza, diversidad, concentración de fenantreno y actividad enzimática. El eje vertical está relacionado con el número de hongos y bacterias.

Podemos ver como los sistemas F2000 y F2000R están significativamente separados y formando grupos. Además, el sistema F2000R (7) tiene propiedades que difieren del resto de los sistemas.

Las variables diversidad y riqueza se encuentran opuestas en el gráfico a concentración de fenantreno y actividad deshidrogenasa, mostrando su fuerte correlación negativa (-0,85). La cantidad de hongos (UFC) también se observa opuesta en el gráfico a la cantidad de Bacterias (UFC) correlación negativa (-0,75)

Figura 3.5. Gráfico Biplots del 1er y 2do eje de PCA.



Representación simultánea de variables y observaciones en el espacio ACP.

3.3.4.2 Análisis Canónico de Correspondencia

Con el objetivo de determinar si las variables descriptivas (concentración de fenantreno y humedad) pueden explicar las frecuencias de las OTUs en los diferentes sitios o punto de medición (días de tratamiento) se utilizó el Análisis Canónico de Correspondencias. Para ello se realizó una tabla de contingencia conteniendo las frecuencias de una serie de OTUs en los diferentes sitios en que se habían contabilizado, F2000 y F2000R, y las variables descriptivas (concentraciones de fenantreno y humedad) medidas en los mismos sitios.

De esta forma se construyó un mapa donde están representados las OTUs, los sistemas y las variables (Figura 3.6).

La variable descriptiva, específicamente concentración de fenantreno (F1 62.34%) explicó la distribución de OTUs, formando un grupo antagónico bien definido con las OTUs 14, 36, 37, 31, 16, 30, 27, 46, 19, 39, 10, 20, 11, 40 y 12.

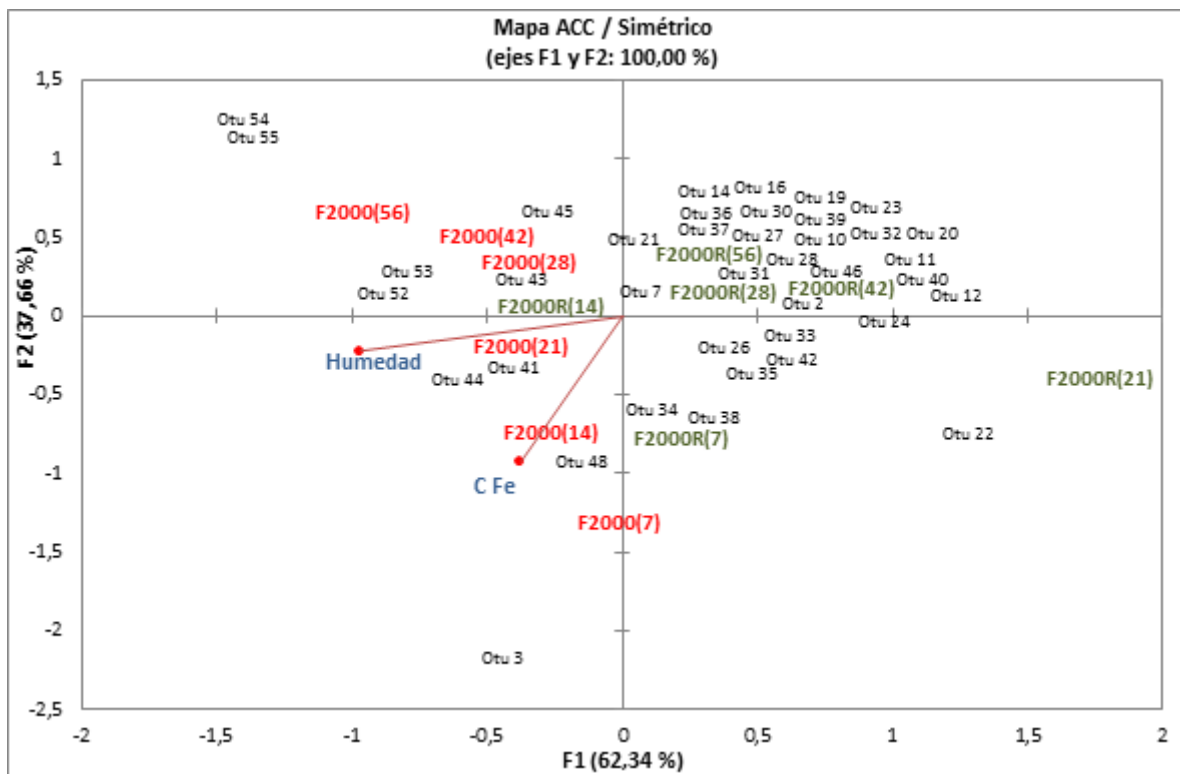
Se observó que el sistema de estudio F2000 y F2000R influye también en la distribución de las OTUs, formando grupos de ellas bien delimitados OTUs 54, 55, 45 52 y 53 relacionados con el sistema F2000, y 4, 36, 37, 31, 16, 30, 27, 48, 19, 39, 10, 20, 11, 40, 12, 33, 42, 35, 24, 26, 22 y 38 relacionados con el sistema F2000R.

Se observan OTUs relacionadas con la alta concentración de fenantreno 48, 44 y 41. Antagónicas a ellas Aparecen OTUs donde la concentración de fenantreno es menor 16, 19, 23 y 20.

Está definida en el gráfico (figura 3.6) la diferencia entre los sistemas F2000 y F2000R, formando dos grupos a la derecha e izquierda del eje vertical, con excepción del sistema F2000 (14) que se encuentra a la izquierda del gráfico.

También es notable como mayor número de OTUs se agrupan cerca del conjunto F2000R.

Figura 3.6. Resultados del ACC.



En la figura se observa la distribución de OTUs en relación a las variables descriptivas y los sistemas de estudio.

3.4 Discusión

Luego de determinar las OTUs en cada sistema y seguir en el tiempo la aparición / extinción de las mismas, se identificó un proceso de sucesión de OTUs caracterizado por un ordenamiento autoorganizado de cambio unidireccional y secuencial en la dominancia relativa de OTUs de la comunidad (Sahney et al. 2008). Específicamente se detectó una sucesión secundaria, un proceso iniciado por un evento natural o accidental (por ejemplo, incendio forestal, cosecha, derrame de tóxicos, etc.) que desorganiza y reduce un ecosistema ya establecido a una comunidad de menor número de especies (Cook et al. 2005). Si bien hay extensa bibliografía acerca de sucesiones secundarias en suelo (Ardhini et al. 2009; Bokhorst et al 2017; Chao et al 2016; Liao et al 2018) la mayoría de los estudios están basados en suelos agrícolas sobre explotados o bosques luego de incendios, y poco se ha estudiado una sucesión en otros sistemas, por lo cual es interesante detectar estos procesos en suelos contaminados.

En cuanto a la estructura de la comunidad microbiana el sistema F2000R tuvo mayor riqueza y diversidad bacteriana que el sistema F2000 según observado con la técnica PCR-DGGE. Un resultado que se esperaba debido al efecto rizosférico. Cabe

aclarar que este efecto influye en el sistema plantado pero no se trata de rizósfera en su totalidad, ya que la influencia de la misma no afecta la totalidad del suelo.

Por otro lado, se observó en el sistema F2000R un incremento del número de microorganismos, una mayor diversidad y una alta actividad metabólica en comparación con el resto del suelo (Martin et al. 2014). Este efecto se observó en todos los días de tratamiento a excepción del día 7, como resultado de la alta concentración de fenantreno que afectó la diversidad como consecuencia del estrés químico provocado por el contaminante. La respuesta que se comprobó en el ACP (estrés químico sobre la comunidad), ya que diversidad y riqueza estaban negativamente correlacionada con la concentración de fenantreno. Estudios anteriores, han demostrado que la presencia de PAH y sus metabolitos en el suelo inciden negativamente la diversidad de la comunidad como resultado del efecto tóxico sobre los microorganismos (Andreoni et al. 2004; Arias et al. 2008).

Otros estudios han demostrado que la diversidad y riqueza de un suelo contaminado también podrían descender debido a la entrada de una nueva fuente de carbono y como consecuencia del cambio de disponibilidad de fenantreno en el tiempo, en función de ello, se seleccionan diferentes consorcios mejor adaptados a la utilización fenantreno como fuente de carbono en diferentes grados de disponibilidad (Drenovsky et al. 2004; Chen et al. 2007).

En el ACP se demostró que las variables diversidad/riqueza y concentración de fenantreno/actividad deshidrogenasa condicionan la estructura de datos de la comunidad.

En el mapa biplot puede observarse la presencia de dos grupos bien definidos F2000 y F2000R, que nos infiere la diferencia existente dada por las características del sistema F2000R antes mencionada.

También se observó que el número de bacterias está negativamente correlacionado con el de hongos, seguramente como efecto competitivo o inhibitorio que resulta de la interacción entre ambos grupos (Begum et al. 2008).

En el ACC que relaciona la abundancia de cada OTU con las variables ambientales, en este caso concentración de fenantreno y humedad, se observó que la distribución de las diferentes OTUs efectivamente está relacionada con estas variables.

La variable descriptiva, específicamente concentración de fenantreno (F1 62.34%) explicó la distribución de OTUs, formando un grupo antagónico bien definido con las

OTUs bien diferenciados, lo que podría explicarse por la tolerancia de las diferentes OTUs al contaminante y la posibilidad de utilizarlas como fuente de carbono. A lo largo del tiempo la concentración de fenantreno y su disponibilidad van cambiando seleccionando las OTUs mejor adaptadas, normalmente los microorganismos del suelo responden ante los disturbios causados por entradas de materia y energía al sistema con cambios en la abundancia de grupos específicos, consecuencia de competencias en la explotación de nuevos sustratos, y la ocupación de nichos de especies que no se adecuan a las nuevas condiciones (Wu et al. 2008).

A pesar de los resultados obtenidos con el ACC, es necesario respaldar estas conclusiones con otros estudios, ya que el desarrollo del experimento se realizó bajo condiciones controladas, y no en el campo donde existen realmente gradientes ambientales, para lo cual esta herramienta estadística fue creada y aporta más información. Sería interesante rever estos resultados en el próximo capítulo cuando se comparen entre sí diferentes tratamientos aportando mayor heterogeneidad al estudio.

Capítulo 4

Análisis del efecto producido por un extracto de raíces de *M. sativa* sobre la remoción de fenantreno y sobre la dinámica de comunidad microbiana asociada.

4.1 Introducción

Estudios anteriores han hipotetizado la fitoestimulación que ocurre en la rizósfera a través de modelos minimalistas como un proceso en el que la raíz proporciona sustratos orgánicos al suelo mediante exudados que inducen la actividad microbiana (Aprill et al. 1990; Fletcher et al. 1995). Si bien las raíces proporcionan al suelo fuentes primarias de carbono que aumentan el crecimiento y la actividad microbiana, actualmente se considera que en la rizósfera ocurren procesos mucho más complejos, donde existen asociaciones y condiciones únicas que contribuyen a la estimulación de la comunidad microbiana (Rainer et al. 2017; Zamani et al. 2018).

En suelos contaminados con PAHs el incremento de la actividad microbiana desencadenada por la fitoestimulación está relacionado con la eficacia de la biodegradación durante el proceso, siendo este el fundamento por el cual la utilización de plantas para remediar suelos es prometedor (Truu et al. 2015).

A pesar de la falta de muchos procesos importantes en el modelo minimalista, estudios anteriores han demostrado que la aplicación de extractos obtenidos a partir de raíces, simulando en parte el mecanismo de exudación radicular, favorecen la degradación de PAH en suelos contaminados (Rentz et al 2005).

La relevancia de este proceso simulado radica en la posibilidad de estimular, a través del agregado de extractos de raíces, la biodegradación de xenobióticos en zonas donde las plantas no pueden desarrollarse con normalidad (Rentz et al 2005).

No obstante, el éxito de este procedimiento radica en la correcta administración del extracto de raíz, ya que muchas comunidades microbianas están adaptadas a bajas concentraciones de nutrientes y la degradación podría cesar con el agregado de fuentes de carbono en exceso (Ciccillo et al. 2002).

En el presente capítulo se estudiará el efecto desencadenado por un extracto de raíces de *Medicago sativa* sobre la dinámica de la comunidad microbiana y sobre la remoción de fenantreno en un suelo artificialmente contaminado, con el fin de aportar resultados que respalden o no, la utilización de extractos como técnica alternativa para remediar suelos contaminados con xenobióticos.

4.2 Objetivo

Analizar el efecto de un extracto de raíces de *M. sativa* sobre la remoción de fenantreno en un suelo artificialmente contaminado y sobre la comunidad microbiana asociada.

4.3 Material y métodos

Se llevó a cabo un experimento que consistió en el seguimiento de un tratamiento con extractos de raíz, para ello se construyeron 3 réplicas de terrarios similares a los utilizados para los Capítulo 2, que fueron tratados con un extracto de raíz obtenidos mediante la técnica de Rentz (2004) Tabla 4.1; nombrado en adelante F2000+E, los cuales fueron cultivados en las mismas condiciones que los tratamientos F2000 y F2000R, destinados a evaluar la eficacia (a 25°C, humedad 20%, y fotoperiodo 14:10).

4.3.1 Preparación de las unidades de estudio

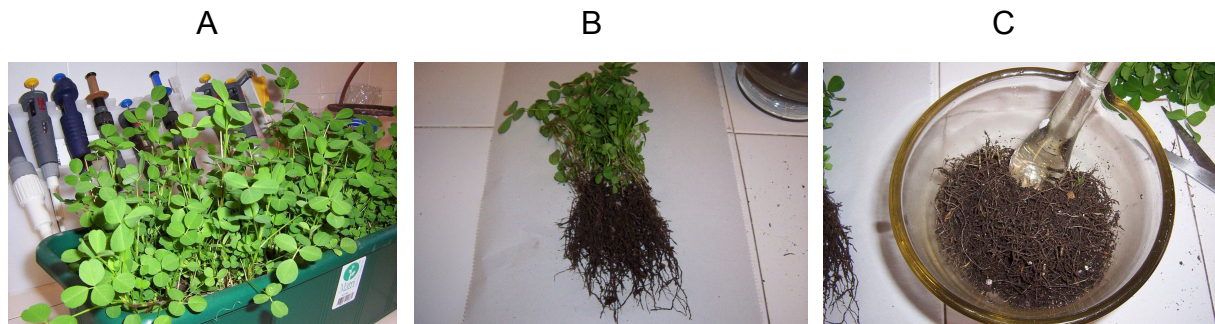
El suelo utilizado para el estudio y su preparación, se realizó siguiendo la metodología descrita en el punto 2.3.1.

Una vez contaminado y homogeneizado, los terrarios fueron tratados con extractos de raíz.

Tabla 4.1. Obtención de extracto de raíz

| Etapa | Procedimiento |
|-------|---|
| 1 | Se cortaron 200 g de raíz y se molieron en mortero (figura 4.1) |
| 2 | Se agregó 200 ml de agua destilada. |
| 3 | Se licuó durante unos minutos. |
| 4 | Se centrifugó 10 minutos a 6000 rpm y se guardó el sobrenadante. |
| 5 | Se filtró varias veces con filtros de porosidad decreciente utilizando para el primer filtrado 100um hasta llegar al último filtrado con un filtro de 0,2 um. |
| 6 | Se guardó en la heladera a 4°C para luego ser utilizado dentro de las 12 hs posteriores a su preparación. |

Figura 4.1 Obtención de la materia prima para realizar los extractos de raíz



A) Plantas de *M. sativa* de 45 días de cultivo antes de ser cosechadas. B) Plantas cosechadas C) Raíces de *M. Sativa* en mortero para molienda.

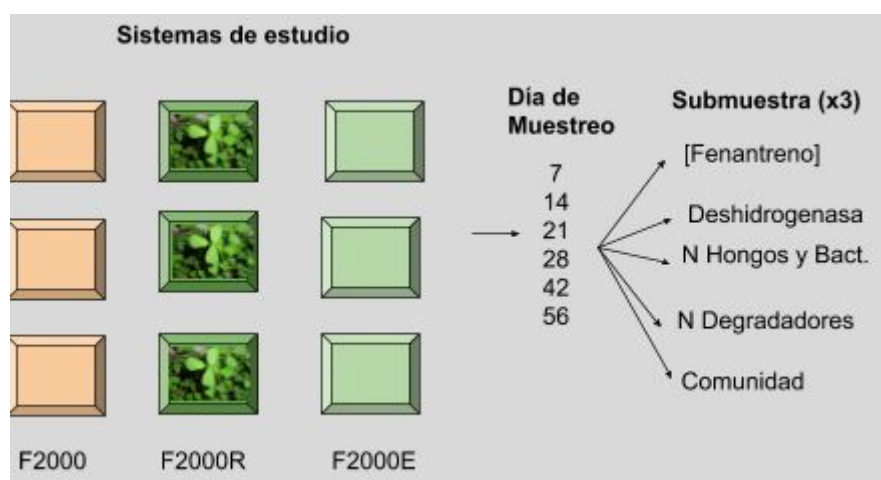
Luego de la obtención del extracto de raíz se añadió al suelo contaminado con 2000 ppm de fenantreno, 15 ml del extracto por cada 100g de suelo.

4.3.2 Análisis de las unidades de estudio

A diferentes tiempos de incubación (7, 14, 21, 28, 42 y 56 días) se tomó una muestra de suelo (50 g) de cada terrario F2000E en forma aleatoria correspondiente a una profundidad de 2 cm para analizar los parámetros que a continuación se detallan y compararlos los terrarios F2000 y F2000R.

En la Figura 4.2 se observa el esquema del diseño experimental.

Figura 4.2. Esquema diseño experimental.



Se cuantificó el fenantreno residual de los sistemas, la actividad metabólica presente en el suelo como actividad deshidrogenasa, la cuantificación de hongos y

bacterias y el número de microorganismos degradadores de PAH siguiendo la metodología descrita en el punto 2.3.2.

La identificación de las Unidades Taxonómicas Operativas (OTUs) para luego ser analizadas como comunidad se realizó siguiendo la metodología descrita en el punto 3.3.

4.3.3 Análisis de la comunidad bacteriana

4.3.3.1 Cálculo de índice de Shannon

El Cálculo del índice de Shannon se determinó siguiendo la metodología descrita en el punto 3.3.4.1.

4.3.3.2 Curvas de rarefacción

El cálculo de las curvas de rarefacción se determinaron siguiendo la metodología descrita en el punto 3.3.4.2.

4.3.3.3 Análisis multivariados (Análisis de componentes principales y Análisis de Correspondencia Canónica)

Con el objeto de ordenar los datos en un espacio bidimensional e inferir qué variables condicionan la estructura de datos de las comunidades en cada sistema se realizaron análisis multivariados, según se especifica en el punto 3.2.4.3.

4.3.4. Análisis estadístico de datos

El efecto de la aplicación de un extracto de raíz de *M. sativa* sobre la concentración de fenantreno en suelo se evaluó analizando si existían diferencias significativas entre los tratamientos F2000E (grupo experimental 1) F2000+R (grupo experimental 2) y F2000 (control) en los valores residuales a lo largo del tiempo. Se evaluó a través de un test de ANOVA de medidas repetidas ($P < 0.05$). Previamente se comprobó la normalidad de los datos con el test Shapiro-Wilk, y se realizó la prueba de esfericidad de la varianza de Mauchly. De encontrarse diferencias significativas los tratamientos se compararon a posteriori con el Test HSD (*Honestly-significant-difference*) de Tukey, un test de comparaciones múltiples. Se realizaron gráficos como una herramienta visual para analizar el comportamiento de las diferentes variables. El análisis estadístico se realizó utilizando el *Software Estadístico R*, versión 3.4.1, y *Software Estadístico XLSTAT 2018*.

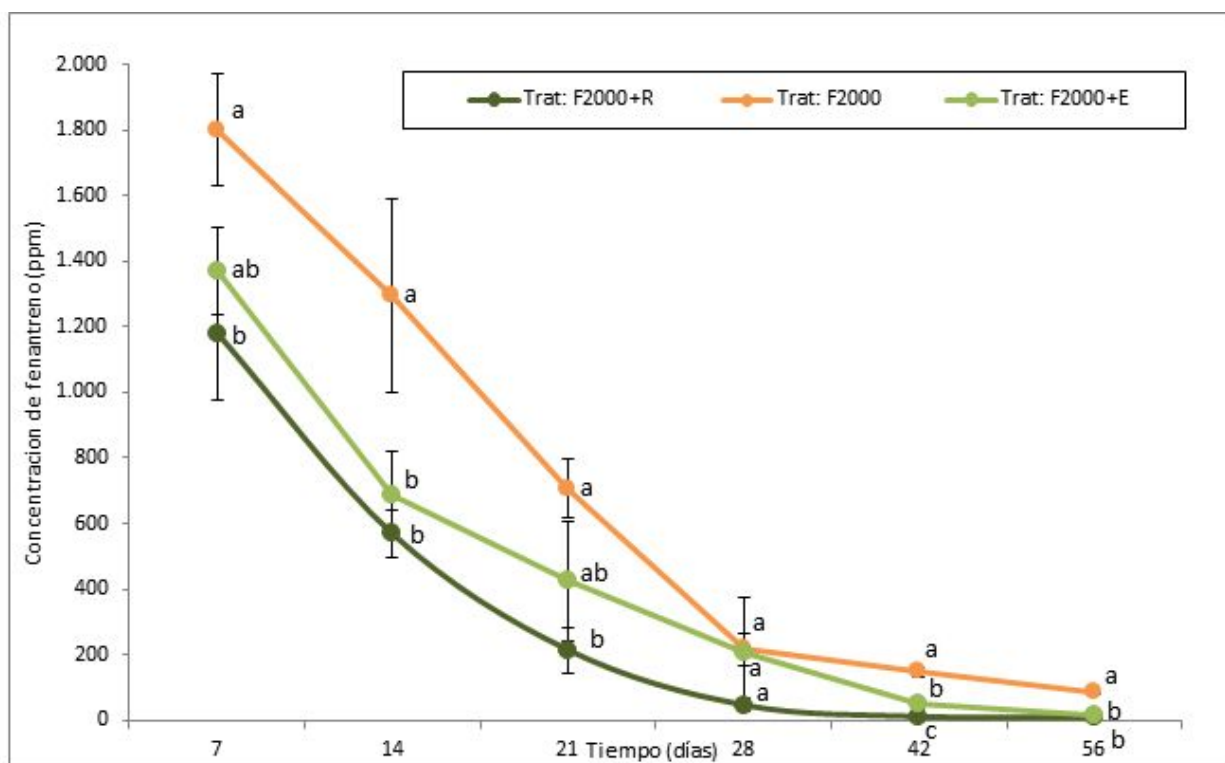
4.4 Resultados

4.4.1. Concentración residual de fenantreno y su cinética de degradación

En el progreso del tratamiento F2000E en el tiempo (figura 4.4), comienza con una velocidad de degradación intermedia, sin diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) hacia el día 7 con un valor promedio de 1370 ppm comparado con las 1798 ppm para el sistema F2000 y 1181 ppm para el sistema F2000R. Durante el resto del tratamiento el sistema F2000E mantiene valores intermedios entre los dos sistemas.

Hacia el final del tratamiento la concentración de fenantreno fue intermedia en el sistema F2000E y estadísticamente significativa ($p < 0.05$), con un valor de 15 ppm con respecto a las 84 ppm para el sistema F2000 y 10 ppm para el sistema F2000R.

Figura 4.4. Cinética de degradación de fenantreno en los sistemas estudiados durante el tratamiento.

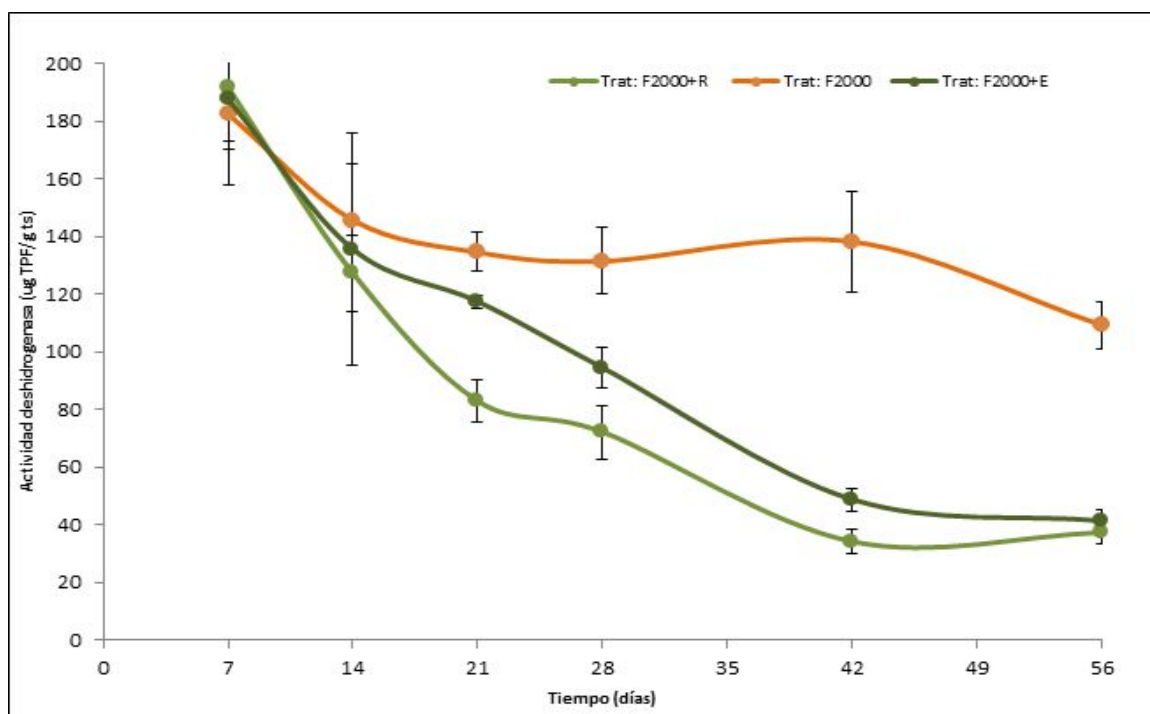


Las barras representan la DS de triplicados. Las diferentes indican diferencias significativas entre las tasas de degradación a partir de las comparaciones post hoc (Test de Tukey; $P < 0,05$). El sistema plantado F2000R y F2000E mantuvieron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) con respecto al sistema control F2000 en algunos puntos durante los días de tratamiento. El sistema F2000E tuvo un comportamiento intermedio entre los dos sistemas.

4.4.2 Actividad deshidrogenasa como estimador de la actividad microbiana

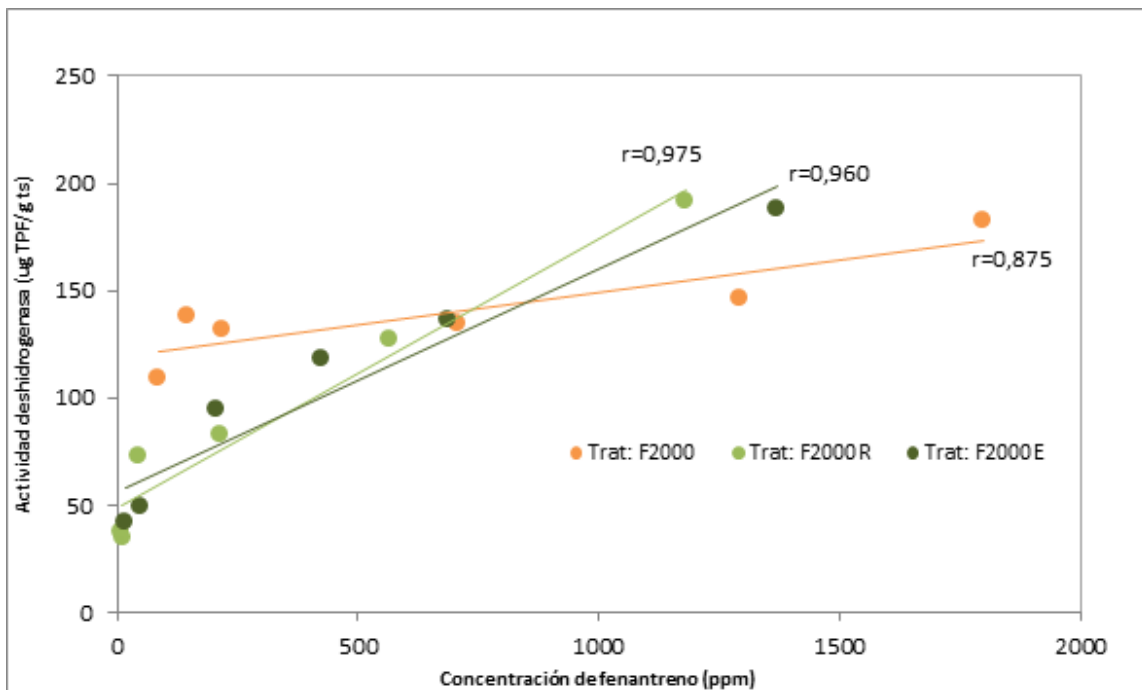
El sistema F2000E también tuvo un comportamiento intermedio entre los sistemas F2000 y F2000R en cuanto a la actividad deshidrogenasa en función del tiempo (figura 4.5). En líneas generales, se observa un descenso de la actividad deshidrogenasa en los sucesivos días de tratamiento en todos sistemas, el hecho se corresponde con el descenso de la concentración de fenantreno. Para evaluar esta relación se estudió la actividad deshidrogenasa en función de la concentración de fenantreno utilizando el Coeficiente de Correlación de Pearson (figura 4.6).

Figura 4.5. Actividad deshidrogenasa en función del tiempo de tratamiento.



Las barras representan la DS de triplicados. Se observa un comportamiento descendente durante el tratamiento.

Figura 4.6. Relación entre la Actividad deshidrogenasa en función de la concentración de fenantreno. Se indica el coeficiente de correlación de Pearson r .



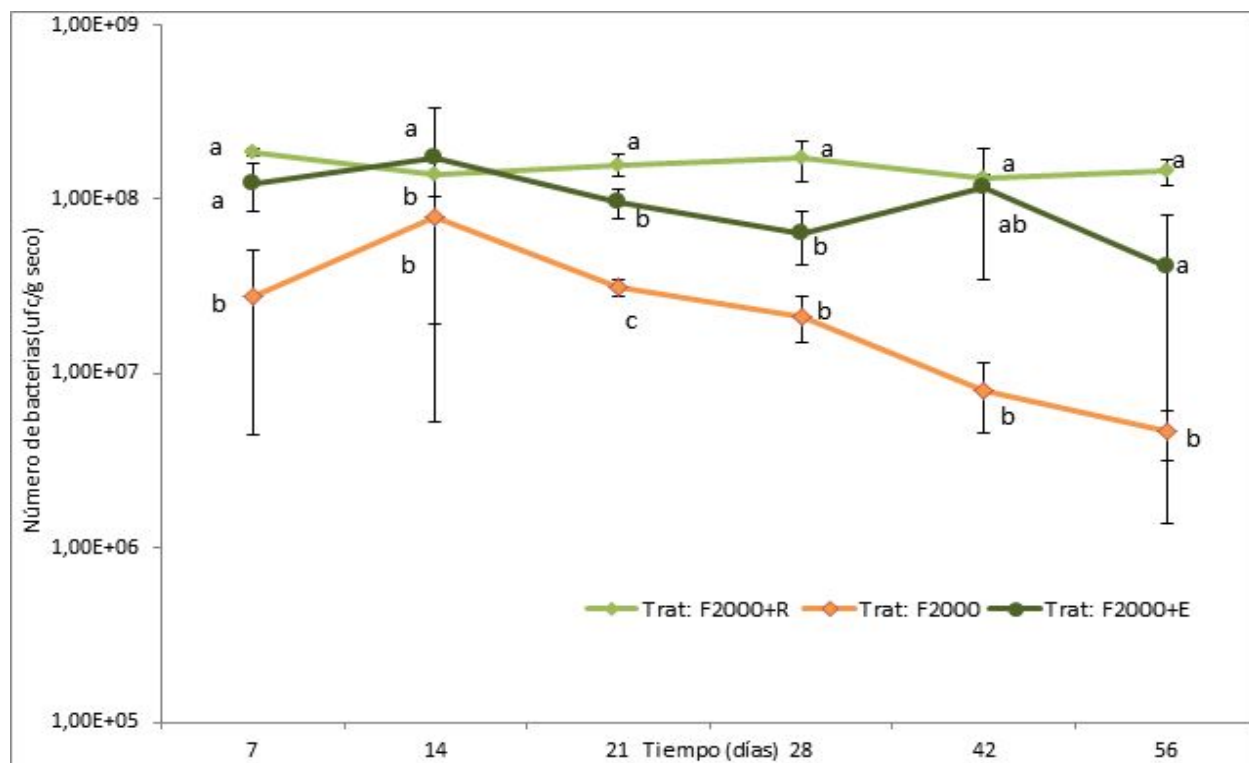
Según el análisis de correlación (figura 4.6), la variable actividad deshidrogenasa acompaña la misma marcha al descender la variable concentración de fenantreno, con un $r=0.875$ para el sistema F2000, $r=0.975$ para el sistema F2000R y $r=0.960$ para el sistema F2000E arrojando todos los sistemas resultados una correlación positiva entre las dos variables.

4.4.3 Número de bacterias heterótrofas y hongos cultivables

Como puede observarse en el gráfico (figura 4.7), las bacterias cultivables en R2A del sistema F2000R y F2000E se mantuvieron cerca de un orden de magnitud por encima del sistema F2000 durante todo el tratamiento.

Si bien el sistema F2000E mantiene valores intermedios con excepción de los días 14 y 42, se continúa observando un comportamiento intermedio entre los sistemas F2000 y F2000R.

Figura 4.7. UFC) de bacterias heterótrofas cultivables durante los días de tratamiento.

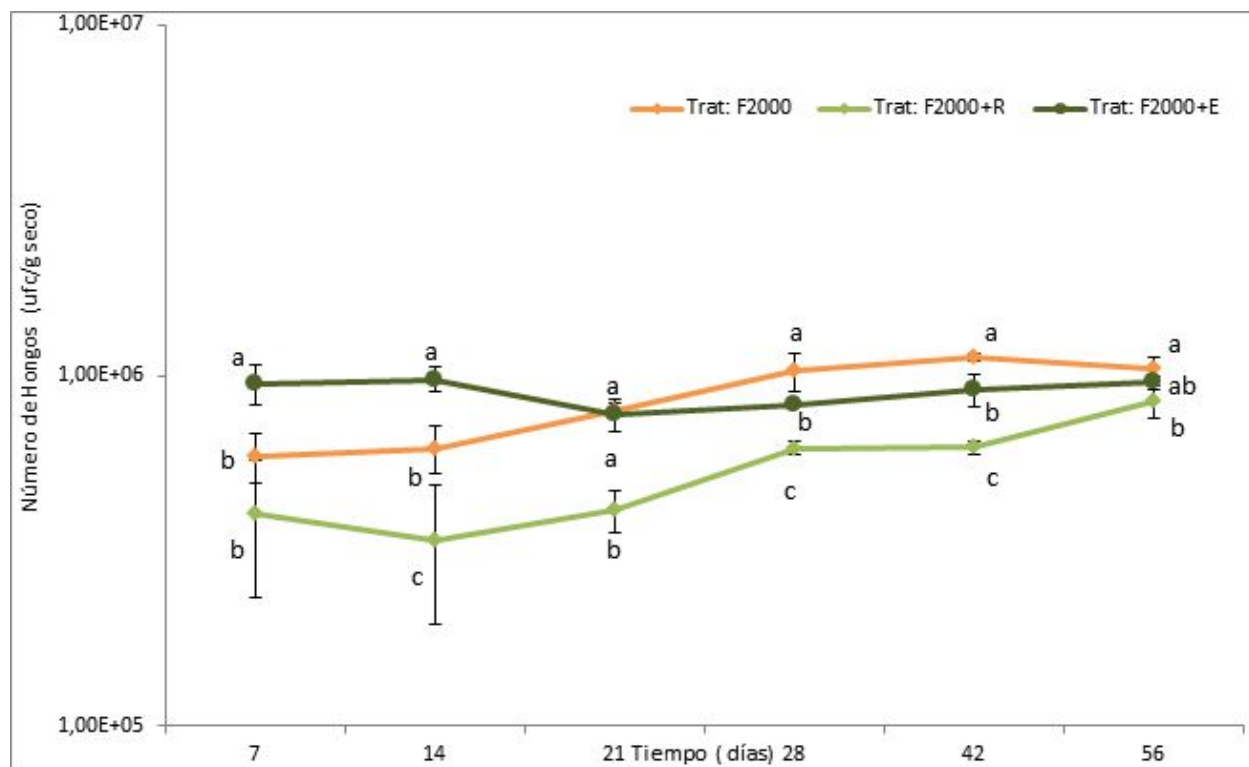


Las barras representan la DS de triplicados. Las diferentes indican diferencias significativas entre el número de bacterias heterótrofas (UFC) a partir de las comparaciones post hoc (Test de Tukey; $P < 0,05$).

En los sucesivos días de tratamiento el sistema F2000 posee un brusco descenso en cuanto al contenido de bacterias (figura 4.7), mientras que en sistema F2000R es más estable en el tiempo. Observando ambos comportamientos, el sistema F2000E es más estable que el sistema F2000 pero menos estable que el sistema F2000R, presentando también un comportamiento intermedio.

Con excepción de los días 7 y 21, el sistema no presentó diferencia significativas con el sistema control F2000, y que sólo los días 21, 28 y 56 presentaron diferencias significativas con el sistema plantado F2000R en cuanto al recuento de bacterias del suelo, presentando algunos días un comportamiento similar al sistema F2000 y otros días un comportamiento semejante al sistema F2000R.

Figura 4.8. Variación del número de unidades formadoras de colonias (UFC) de hongos cultivables con relación al tiempo de tratamiento.



Las barras representan la DS de triplicados. Las diferentes indican diferencias significativas entre el número de hongos (UFC) a partir de las comparaciones post hoc (Test de Tukey; $P < 0,05$).

El recuento de hongos en los sucesivos días de tratamiento (figura 4.8) fue mayor en el sistema F2000E los días 7 y 14 empezando a disminuir hacia el día 21 para ubicarse en valores intermedios entre los sistemas F2000 y F2000R.

El ANOVA arrojó que existían diferencias significativas en cuanto al recuento de hongos en el sistema F2000E con respecto al sistema F2000 y F2000R los primeros días de tratamiento (día 7 y 14), para luego disminuir el recuento y asemejarse al sistema F2000 el día 21, ubicándose en valores intermedios el resto del tratamiento.

4.4.4 Número de microorganismos degradadores de PAH

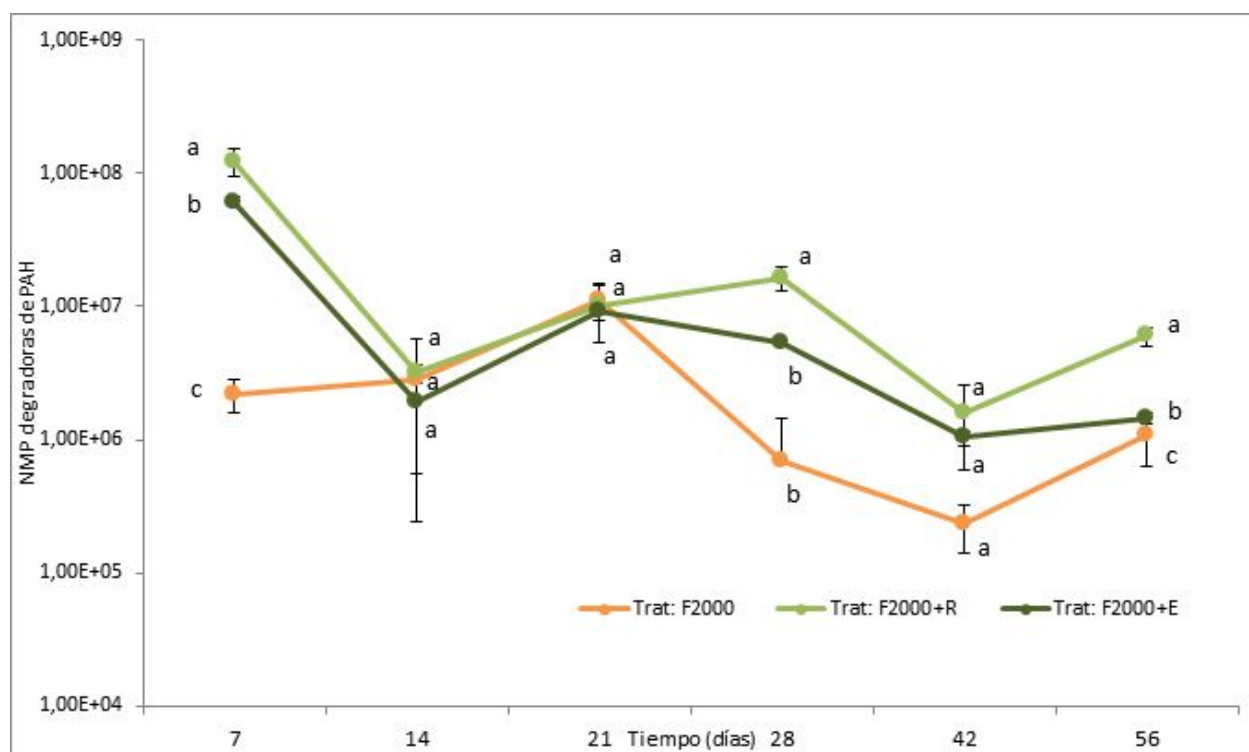
De la observación del gráfico NMP/día (figura 4.9), se deduce que el número de degradadoras en todos sistemas tiene un comportamiento fluctuante, siendo mayor el NMP de degradadoras la primera semana de tratamiento, para luego ir decayendo en las sucesivas semanas. La primera semana de tratamiento los sistemas F2000R y F2000E se encuentran 2 órdenes de magnitud por encima del sistema F2000. Los días

14 y 21 no mostraron diferencias entre los dos sistemas estudiados.

Luego de este periodo el NMP de degradadoras comienza a aumentar hacia el día 28 en todos los sistemas. El sistema F2000E permanece en valores intermedios entre los sistemas F2000R superior y F2000 inferior durante el resto del tratamiento a pesar de las fluctuaciones.

El ANOVA y test a posteriori determinó que el día 7 existen diferencias significativas entre todos los sistemas, en los días posteriores se observa un descenso en el NMP de degradadoras, los días 14 y 21 no existieron diferencias significativas entre los sistemas estudiados a excepción de los días 28 y 56.

Figura 4.9. Variación del (NMP) de degradadoras por gramo de suelo seco en relación al día de tratamiento.



Las barras representan la DS de triplicados. Las diferentes indican diferencias significativas entre el NMP de degradadoras a partir de las comparaciones post hoc (Test de Tukey; $P < 0,05$).

4.4.5 Análisis de la comunidad microbiana PCR-DGGE

Se observó valores intermedios del Sistema F2000E con 89 bandas en relación al mayor número de bandas el sistema F2000R, en total 114 bandas y al menor número del sistema F2000 donde se contabilizaron 46 bandas en total.

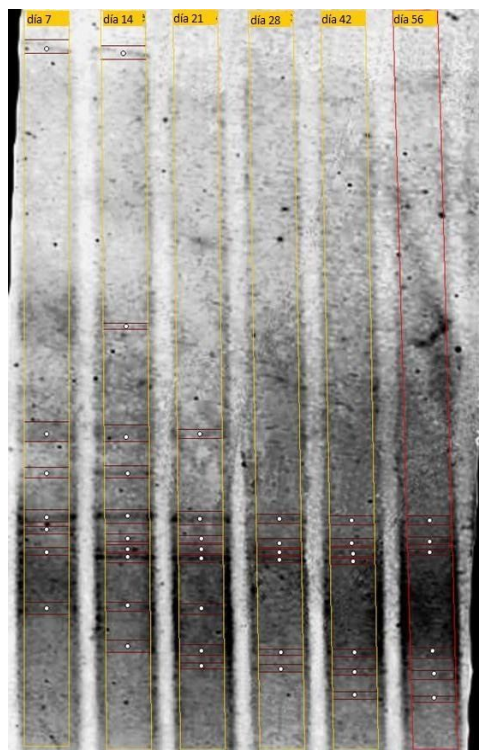
En los sucesivos días de medición el sistema F2000 se mantuvo estable en cuanto al número de bandas (7 bandas los primeros días de tratamiento y 6 bandas al finalizar). sin embargo el sistema F2000R tuvo un comportamiento completamente diferente, se observaron pocas bandas los primeros días de tratamiento (5 bandas) para luego ir aumentando los sucesivos días de tratamiento hasta llegar a un máximo de 34 bandas el día 42, para finalizar el día 56 con 26 bandas.

El sistema F2000E tuvo un comportamiento similar al sistema F2000 solo que con mayor número de bandas fluctuando en valores de 16 a 15.

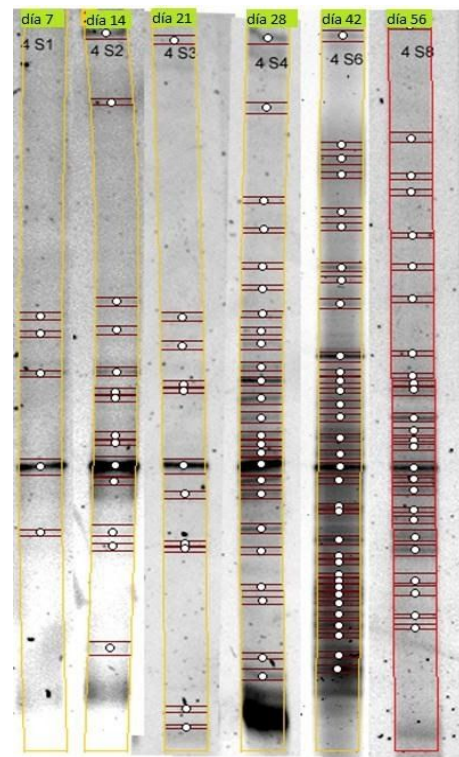
En la figura 4.7 puede observarse ambos geles y la distribución de bandas a lo largo de los sucesivos días de tratamiento.

Al igual que en capítulo anterior se observó una sucesión de especies en el tiempo en el sistema F2000E. Una sucesión ecológica se define como un proceso ordenado de auto-organización de un sistema complejo con ciertos niveles de homeostasis (Zhou et al. 2014), caracterizado por un cambio unidireccional, secuencial en la dominancia relativa de especies de una comunidad (Sahney et al. 2008). Según esta definición se podría explicar la aparición / extinción de grupos de OTUs en el tiempo.

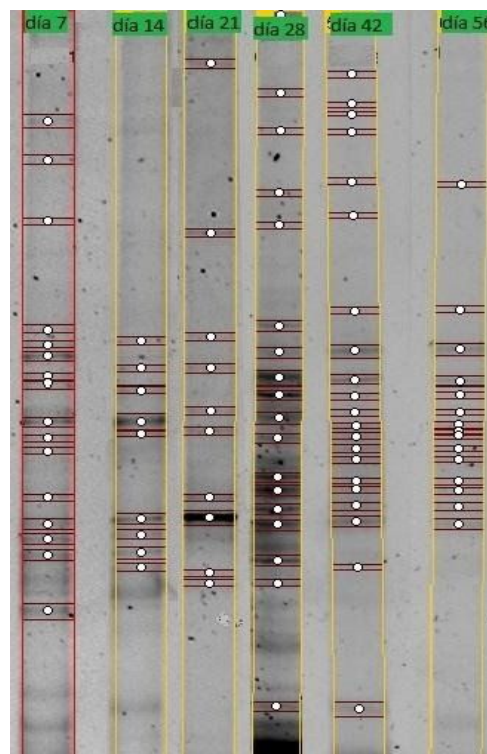
Figura 4.10. Análisis de geles Sistemas F2000, F2000R y F2000E.



F2000



F2000R



F2000E

En esta figura se observa el perfil de bandas correspondientes al sistema F2000 y F2000R (arriba) y el sistema F2000E (abajo) en los diferentes días de incubación analizados por el software *Gel Analyzer 2010*.

Tabla 4.2. Dinámica de la comunidad en los sucesivos días de tratamiento.

F2000E

| Día | 7 | 14 | 21 | 28 | 42 | 56 |
|--------------------|--|-----------------------------------|---|---|---|---|
| Bandas detectadas | 16 | 9 | 10 | 19 | 21 | 15 |
| OTUs identificadas | 1,2,3,4,5, 6,7,8,9, 10,11,12, 13,14,15, 16 | 5,9,10,13, 15,17,18, 19,20 | 5,10,13,17, 21,22,23, 24,25,26 | 10,13,17,23,26 27,28,29,30,31, 32,33,34,35,36, 37,38,39,40 | 10,13,17,23,29, 30,34,35,36,39, 40,41,42,43,44, 45,46,47,48,49, 50 | 10,13,17,23,34,35, 36,43,45,46,47,48, 49,50,51 |
| OTUs extintas | - | 1,2,3,4,6,7, 8,11,12,14, 16 | 9,15,18,19, 20 | 5,21,22,24,25 | 26,27,28,31,32 33,37,38 | 29,30,39,40,41,42 44 |
| Acumulado | - | 1,2,3,4,6,7, 8,11,12,14, 16 | 1,2,3,4,6,7, 8,9,11,12, 14,16, 18, 19,20 | 1,2,3,4,5,6,7,8, 9,11,12, 14,16, 18, 19,20,21,22,24, 25 | 1,2,3,4,5,6,7,8,9 ,11,12, 14,16, 18, 19,20,21,22,24, 25,26,27,28,31, 32,33,37,38 | 1,2,3,4,5,6,7,8,9 11,12, 14,16, 18, 19,20,21,22,24,25, 26,27,28,29,30,31, 32,33,37,38,39,40, 41,42,44 |

En la siguiente tabla se observa la dinámica de la comunidad en los sucesivos días de tratamiento. En verde la aparición de nuevas OTUs. En rojo la extinción de OTUs. El total acumulado especifica las OTUs extintas desde el inicio del tratamiento hasta el día de medición. Las OTUs se identificaron utilizando el *Gel Analyzer 2010*.

El efecto del cambio de las OTUs se hace evidente el sistema F2000E al igual que en los sistemas estudiados F2000R y F2000.

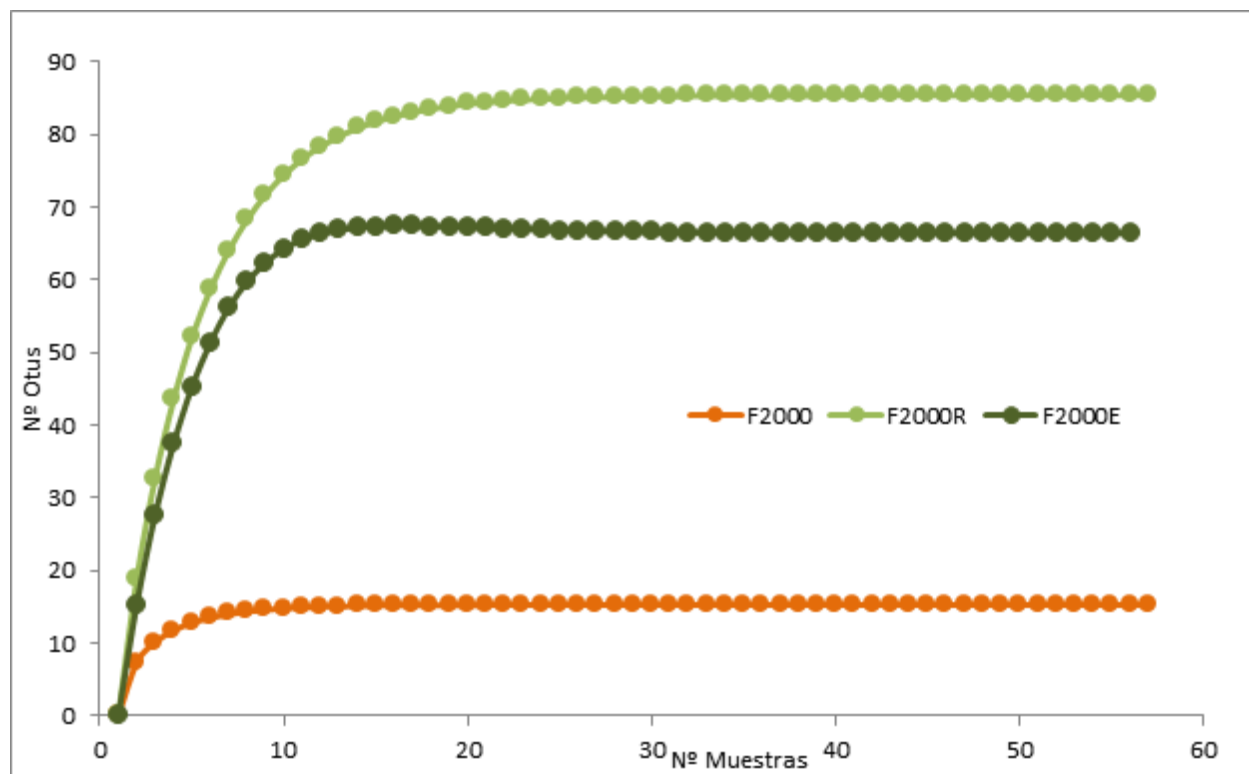
En este sistema, las OTUs pioneras-oportunistas 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 11, 12, 14, y 16 dominan la comunidad por un periodo muy breve para desaparecer el día 14, donde son reemplazadas por otras OTUs (17, 18, 19 y 20), las cuales a su vez son reemplazadas por otras (27, 28, 29, 31 y 32) que desaparecen al siguiente punto de medición el día 42, hasta llegar a un punto donde la riqueza no aumenta. Las OTUs 10, 13, 17 y 23 permanecen todo en tratamiento. Las OTUs 10, 13, 17 y 23 permanecen todo en tratamiento. En algunas OTUs las etapas de dominancia están solapadas y los límites se tornan difusos como la OTU 5 y 9 permaneciendo más de una etapa.

Si bien el proceso de sucesión ecológica es difuso y es complicado establecer el límite de cada etapa, está clara la sustitución de unas OTUs por otras en todos los sistemas estudiados.

4.4.6 Estructura de la comunidad bacteriana

La riqueza calculada a través de las curvas de rarefacción ($p = 0.05$) tuvo valores intermedios para el sistema F2000E ($63.75 \text{ OTUs} \pm 4.34$) en relación al la mayor riqueza del sistema F2000R ($85.33 \text{ OTUs} \pm 9.69$) y los valores de riqueza más baja del sistema F2000 ($15.25 \text{ OTUs} \pm 1.91$) (figura 4.11).

Figura 4.11. Curvas de rarefacción sistemas F2000, F2000R y F2000E.



La diversidad H' de los sistemas F2000 y F2000E presentó un comportamiento similar a lo largo del tiempo (figura 4.12) con leves fluctuaciones.

En el sistema F2000R el comportamiento fue diferente aumentando gradualmente con el día de tratamiento. El sistema F2000E presenta mayores índices de diversidad a 7 días de tratamiento ($H'=2,73$) con respecto al sistema F2000R ($H'=1,35$) y F2000 ($H'=1,86$). Sin embargo a partir del día 21 la diversidad H' del sistema F2000R comienza aumentar superando al resto de los sistemas, con valores finales a los 56 días de $H'= 1.76$ para el sistema no plantado F2000, $H'= 2.66$ para el sistema F2000E y $H'=3.14$ para el sistema F2000R (figura 4.12)

En la Tabla 4.3 se pueden observar todos los valores calculados para los sistemas F2000E, F2000 y F2000R utilizando *BiodiversityR*.

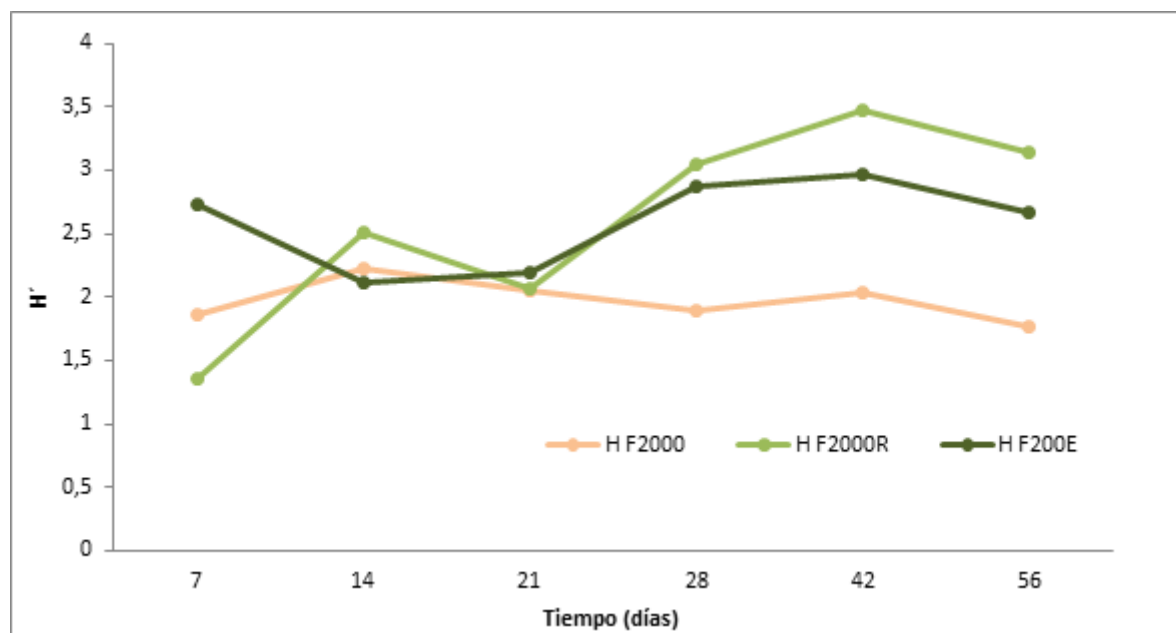
Tabla 4.3. Cálculo de índices de diversidad H' en los diferentes días de tratamiento (*BiodiversityR*).

| Ind Div Día/ Sist. | Shannon index H' | | |
|-----------------------|--------------------|--------|--------|
| | F2000 | F2000R | F2000E |
| Día 7 | 1,86 | 1,35 | 2,73 |
| Día 14 | 2,22 | 2,51 | 2,12 |
| Día 21 | 2,05 | 2,06 | 2,20 |
| Día 28 | 1,89 | 3,04 | 2,88 |
| Día 42 | 2,04 | 3,47 | 2,97 |
| Día 56 | 1,76 | 3,14 | 2,66 |

En la siguiente tabla se expresan los diferentes índices de diversidad calculados con *BiodiversityR*.

El sistema F2000R con excepción del primer día de medición y el día 21, posiblemente por la perturbación causada por el contaminante, es el que mantiene la mayor diversidad durante todo el tratamiento seguido por el sistema F2000E. Como era de esperar el sistema F2000 presenta los menores índices de diversidad durante la mayor parte del tratamiento.

Figura 4.12. Índice de diversidad Shannon-Wiener en función del tiempo.



Se observa en el gráfico un comportamiento fluctuante en todos los sistemas, que a medida del transcurso del tratamiento va aumentando en líneas generales para luego al final (día 56) decaer levemente.

4.4.5.2 Análisis multivariados (Análisis de componentes principales y Análisis de Correspondencia Canónica)

Análisis de componentes principales (ACP):

El ACP con los ejes F1 y F2 (tabla 4.8) representó el 77.1% de la varianza. En el gráfico biplot (Figura 4.13) se observa el eje horizontal relacionado con riqueza, diversidad, concentración de fenantreno y actividad enzimática, el cual representó el 48.18% de la varianza, y el eje vertical relacionado con el número de hongos y bacterias representando el 28,97% de la varianza.

En la tabla 4.6 se presentan las variables y los sistemas de estudio.

En la matriz de correlaciones ($p = 0.05$) (Tabla 4.5) podemos observar las variables relacionadas, diversidad con riqueza (0.95) y actividad deshidrogenasa con concentración de fenantreno (0.83). Estos dos grupos de variables representan el 77.1% de la variabilidad total de los datos, lo cual nos asegura que los mapas a partir de los dos primeros factores son una proyección de buena calidad de la tabla multidimensional inicial.

Tabla 4.4. Matriz de datos ACP.

| Sistemas | H' | Riqueza | BUFC | HUFC | Degr | C FE | Act. DesH |
|------------|------|---------|----------|----------|-----------|------|-----------|
| F2000(7) | 1,86 | 7 | 2,80E+07 | 5,86E+05 | 2187624 | 1798 | 183 |
| F2000(14) | 2,22 | 10 | 7,98E+07 | 6,20E+05 | 2833774 | 1293 | 146 |
| F2000(21) | 2,05 | 8 | 3,12E+07 | 7,96E+05 | 11088271 | 707 | 135 |
| F2000(28) | 1,89 | 7 | 2,13E+07 | 1,03E+06 | 696182 | 218 | 132 |
| F2000(42) | 2,04 | 8 | 7,99E+06 | 1,12E+06 | 232774 | 148 | 138 |
| F2000(56) | 1,76 | 6 | 4,64E+06 | 1,04E+06 | 106769 | 384 | 109 |
| F2000R(7) | 1,35 | 5 | 1,86E+08 | 4,02E+05 | 123844161 | 1181 | 192 |
| F2000R(14) | 2,51 | 14 | 1,39E+08 | 3,40E+05 | 3163664 | 569 | 127 |
| F2000R(21) | 2,06 | 10 | 1,58E+08 | 4,13E+05 | 10193577 | 215 | 83 |
| F2000R(28) | 3,04 | 25 | 1,71E+08 | 6,19E+05 | 16316618 | 48 | 72 |
| F2000R(42) | 3,49 | 34 | 1,31E+08 | 6,22E+05 | 1582227 | 12 | 34 |
| F2000R(56) | 3,14 | 26 | 1,44E+08 | 8,43E+05 | 6010302 | 10 | 37 |
| F2000E(7) | 2,70 | 16 | 1,22E+08 | 9,46E+05 | 61119357 | 1370 | 187 |
| F2000E(14) | 2,12 | 9 | 1,71E+08 | 9,75E+05 | 1922442 | 689 | 135 |
| F2000E(21) | 2,20 | 10 | 9,59E+07 | 7,75E+05 | 9138574 | 425 | 117 |
| F2000E(28) | 2,88 | 19 | 6,33E+07 | 8,26E+05 | 5373203 | 207 | 94 |
| F2000E(42) | 2,97 | 21 | 1,16E+08 | 9,08E+05 | 1036534 | 48 | 48 |
| F2000E(56) | 2,66 | 15 | 4,11E+07 | 9,55E+05 | 1450659 | 15 | 41 |

* Estructura de la Matriz: Observaciones/Variables. Abreviaturas: BUFC : Bacterias unidades formadoras de colonias por gramo de tierra seca. HUFC: Hongos unidades formadoras de colonias por gramo de tierra seca. Degr : Número más probable bacterias degradadoras por gramo de tierra seca. C FE: concentración de fenantreno ppm. Act. DesH: Actividad deshidrogenasa

Tabla 4.5. Matriz de correlaciones ACP (Pearson).

| Variables | H' | Riqueza | BUFC | HUFC | Degra | C FE | Act. DesH |
|-----------|----|---------|-------|--------|--------|--------|-----------|
| Div H | 1 | 0,959 | 0,288 | 0,041 | -0,333 | -0,455 | -0,721 |
| Riqueza | | 1 | 0,392 | -0,081 | -0,197 | -0,461 | -0,726 |
| BUFC | | | 1 | -0,557 | 0,440 | 0,020 | -0,126 |
| HUFC | | | | 1 | -0,327 | -0,318 | -0,109 |
| Degr | | | | | 1 | 0,436 | 0,506 |
| CFE | | | | | | 1 | 0,836 |
| DesH | | | | | | | 1 |

El primer resultado a consultar es la matriz de correlaciones. Podemos ver de inmediato qué variables están relacionadas. Por ejemplo diversidad - riqueza y Act. Desh - Conc. Fenantreno.

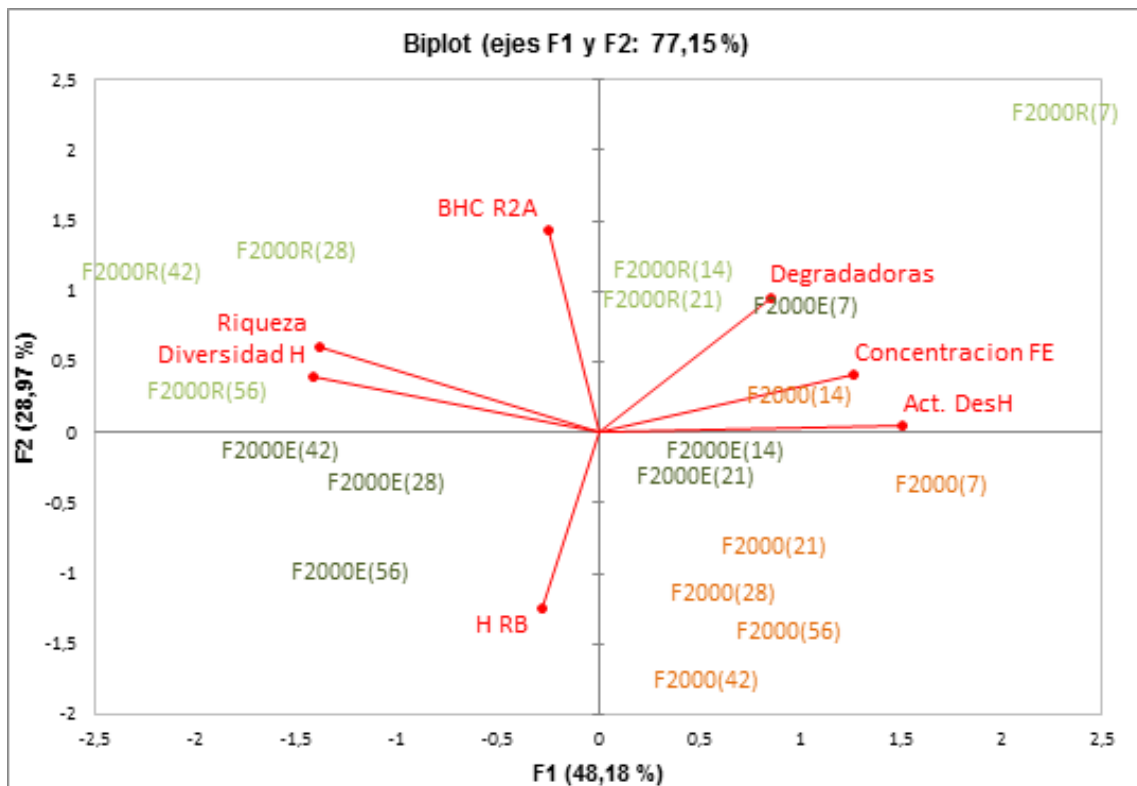
En la Figura 4.13 se observa que F2000E, F2000 y F2000R están separados y formando grupos. Además, el sistema F2000R (7) tiene propiedades que difieren del resto de los sistemas, encontrándose alejado de otros grupos en el gráfico. El grupo

F2000E se encuentra entre los grupos F2000 y F2000R, seguramente por sus características intermedias antes observadas.

Las variables diversidad y riqueza se encuentran opuestas en el gráfico a concentración de fenantreno y actividad deshidrogenasa, mostrando su correlación negativa (-0,72). La cantidad de hongos (UFC) también se observa opuesta en el gráfico a la cantidad de Bacterias (UFC).

Los vectores diversidad y riqueza aumenta hacia la izquierda, por lo tanto los grupos que se encuentran a la izquierda son los que presentaron mayor valor de estas variables, este grupo está formado por puntos de los sistemas F2000R y F2000E.

Figura 4.13 Mapa Biplots



Representación simultánea de variables y observaciones en el espacio ACP.

Análisis Canónico de Correspondencia

La variable descriptiva, específicamente concentración de fenantreno (F1 52.15%) explicó la distribución de OTUs, formando varios grupos antagónicos, entre ellos algunos bien definidos formado por las OTUs 39, 19, 16, 30, 11, 20, 12, 46, 27, 31, 32, 45 y 37 relacionados con la baja concentración de fenantreno y otro grupo

antagónico relacionado con las concentraciones más altas formado por las OTUs 40, 35, 10, 38, 34, 3, 41 y 44 (figura 4.14).

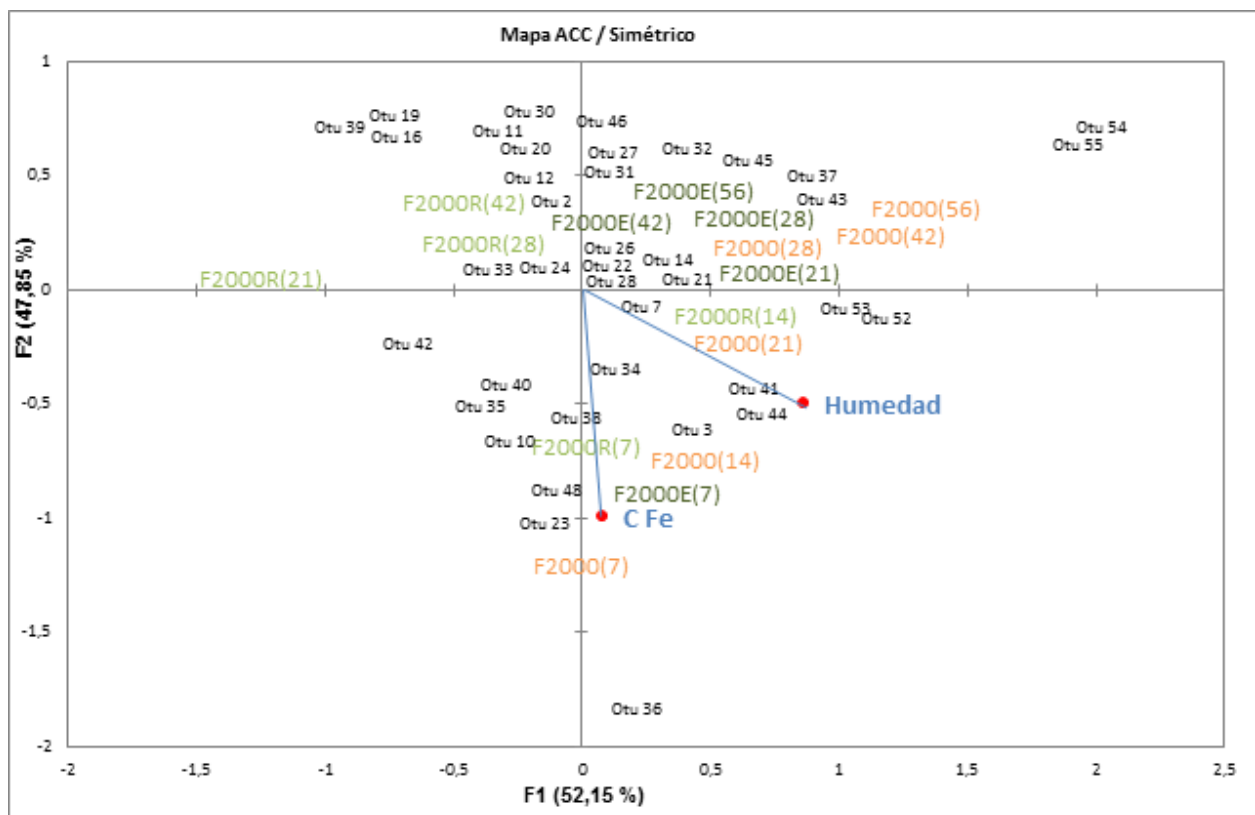
Se observó que los sistemas de estudio F2000E, F2000 y F2000R influyen también en la distribución de las OTUs, formado grupos de ellas como las OTUs 39, 16 y 19 o 30, 1, 20, y 12 relacionados con el sistema F2000R, y se observaron las OTUs 41, 44 y 3 relacionadas con el sistema F2000.

Los sistemas de estudio se ubican formando 3 grupos difusos a lo largo del eje vertical F1 donde se ubica entre los sistemas F2000 y F2000R el sistema F2000E.

Las Otus 55 y 44 se ubican en condiciones extremas en el cuadrante superior derecho, al igual que la OTU 36 en el cuadrante inferior derecho.

También es notable como mayor número de OTUs se agrupan cerca del conjunto F2000R y F2000E.

Figura 4.14 Gráfico resultante del análisis canónico de correspondencia.



Se representación simultánea de variables y observaciones en el espacio ACC

4.5. Discusión

Luego del análisis de los resultados obtenidos en el sistema F2000E y su posterior comparación con los sistemas F2000 y F2000R, se observó un

comportamiento intermedio en cuanto a la cinética de degradación y la dinámica de la comunidad microbiana, sugiriendo el potencial remediador de los extractos radiculares para la activación de la microbiota involucrada en la biorremediación de suelos contaminados donde existe un crecimiento vegetal limitado o nulo.

Estudios anteriores exponen un aumento en el potencial degradador en comparación con el suelo no tratado utilizando extractos de raíz o exudados artificiales en los cuales se había intentado reemplazar la rizósfera pero sin llegar a las tasas de degradación observadas en el suelo rizosférico (Rentz et al. 2005; Xie et al. 2012). Contrariamente, otros estudios que utilizaron extractos de raíz en suelo para acelerar los procesos de degradación de hidrocarburos han observado un potencial inhibitorio de los extractos de raíces sobre la expresión de genes relacionados con las enzimas deshidrogenasas, importantes para la actividad microbiana compatible con las tasas de degradación inferiores a lo esperado (Kamath et al. 2004; Louvel et al. 2011). Por lo tanto, el tipo de fuente vegetal o un extracto son clave, siendo necesarios más estudios de optimización y la identificación de los compuestos mayoritarios para inferir los procesos involucrados en la activación de la microbiota degradadora natural del suelo.

Se ha comprobado que la cinética de degradación de PAH en la rizósfera puede ser significativamente superior en comparación con el suelo no plantado (Fan et al. 2008; Liu et al. 2013) e inclusive superior al suelo tratado solo con extractos de raíz como se ha observado en el presente capítulo, donde sólo el último día de tratamiento y la segunda semana los sistemas F2000R y F2000E no presentan diferencias significativas y difieren significativamente del sistema F2000 ($p < 0.05$).

En el modelo minimalista, el efecto positivo de las plantas en la eliminación de la PAH se atribuye principalmente al aumento de la actividad microbiana y al aumento de la solubilidad de la PAH a través de los exudados radicales (Cébron et al. 2011; Louvel et al. 2011; Thomas y Cébron 2016), que aumentan además la biomasa y la diversidad microbiana mediante la liberación de nutrientes y oxígeno en el suelo (D'Orazio et al. 2013; Muratova et al. 2015).

La tendencia contrastante de que las plantas o los exudados no tienen ningún efecto o incluso un efecto inhibitorio sobre la degradación de la PAH se ha informado en otros estudios (Rezek et al. 2008; Phillips et al. 2012). Debido a este contraste de observaciones, el papel de la planta y la comunidad microbiana asociada en la

eliminación de PAH aún no se comprende claramente y es necesario realizar nuevos estudios al respecto (Guo et al. 2017).

Los resultados obtenidos en el presente capítulo difieren en parte de ambos modelos y se asemejan a las conclusiones de diferentes trabajos, donde se postula la existencia de procesos complejos y poco conocidos que requieren un mayor estudio, con asociaciones y condiciones únicas entre las raíces de las plantas y la comunidad rizosférica asociada que contribuyen a la mayor cinética de degradación observada (Rainer 2017; Zamani et al. 2018).

Un ejemplo de estos procesos poco estudiados lo constituye el cambio de OTUs detectada en los sistemas F2000, F2000R y F2000E. Luego de la perturbación generada por el contaminante fenantreno al ser agregado a los sistemas, se genera un proceso que desorganiza y reduce el ecosistema ya establecido a una comunidad de menor número de especies (Cook et al. 2005). Luego de la perturbación, se identificó un ordenamiento autoorganizado de cambio unidireccional y secuencial en la dominancia relativa de OTUs de la comunidad (Sahney et al. 2008). Los estadios de los diferentes estados y la dinámica de la comunidad en cada sistema difieren entre sí y poseen características propias, según se observó en el presente capítulo.

En los primeros días de tratamiento, se observó la existencia de consorcios de bacterias pioneras que pueden aprovechar el contaminante como fuente de carbono y a la vez tolerar su efecto tóxico, luego este consorcio es reemplazado por otro que se adapta mejor a la degradación de PAH en concentraciones menores y a la vez puede utilizar como fuente de carbono sus metabolitos reemplazando así al primer consorcio y dando lugar a la sucesión ecológica (Sahney et al. 2008).

Un estudio anterior relacionado a la sucesión de especies observada en este capítulo, muestra que bacterias específicas se asocian con diferentes fases de la degradación de PAH y a la vez sugiere que existen interacciones complejas entre especies bacterianas y condiciones del medio, que influyen en la capacidad de biodegradación de las comunidades microbianas que participan en los procesos bioremediation a lo largo del tiempo. (Viñas et. al 2005).

La concentración de fenantreno explicó la distribución de OTUs, formando grupos antagónicos de OTUs bien definidos, lo que podría explicarse por la tolerancia de las diferentes OTUs al contaminante y la posibilidad de utilizarlas como fuente de carbono (Wu et al. 2008).

Se observó que el sistema de estudio F2000 y F2000R influye también en la distribución de las OTUs, formado grupos de ellas bien delimitados OTUs, no ocurre lo mismo con el sistema F2000E, el cual comparte características intermedias con ambos sistemas compartiendo diferentes OTUs con ellos.

A pesar de los resultados obtenidos, es necesario respaldar estas conclusiones con otros estudios, ya que el desarrollo del experimento se realizó bajo condiciones controladas y no en el campo donde la naturaleza multifactorial del ambiente natural no hace posible el estudio y la comprensión de todos los procesos involucrados en la degradación de PAHs.

Capítulo 5

Conclusiones Generales

Este trabajo de tesis reporta, de acuerdo a lo consultado, por primera vez el comportamiento en el tiempo de una comunidad microbiana en un suelo plantado luego de ser perturbada por el contaminante fenantreno, relacionándola con la cinética de degradación y la actividad enzimática. A su vez, se compara este sistema de estudio con un suelo no plantado y otro tratado con extractos de raíz, para establecer la contribución que pueden tener los exudados en el proceso de rizoremediación, con el fin de optimizar a futuro la técnica de remediación.

Los estudios sobre la rizoremediación de hidrocarburos en suelos contaminados han sido orientados mayormente hacia una cuantificación de las tasas de remoción del contaminantes en diferentes condiciones y tratamientos (Rentz et al. 2005; Xie et al. 2012; Benson et al. 2017; Thomas et al. 2017; Wei et al. 2017; Yubo et al. 2017) y poco se ha estudiado los cambios de la comunidad rizosférica a lo largo del tiempo, las interacciones y relaciones con diferentes variables de este ecosistema.

Otros trabajos que abordan el estudio de la comunidad lo hicieron analizando sólo la riqueza (Louvel et al. 2011) o estableciendo la identificación taxonómica de las bandas predominantes recuperadas de los perfiles genómicos de los diferentes tratamientos analizados, sin poder contribuir a la dinámica de la comunidad microbiana (Ortiz et al. 2017).

5.1 Conclusiones

1-La aplicación de plántulas de *M. sativa* contribuye a la remediación de un suelo previamente contaminado con fenantreno. La rizósfera asociada constituye un micro hábitat que alberga bacterias con capacidad degradadora.

2- El sistema F2000R tiene mayor riqueza y diversidad bacteriana que todos los sistemas estudiados, estando estas variables correlacionadas negativamente con la concentración de fenantreno a causa del efecto tóxico que presenta el contaminante y la entrada al medio de una nueva fuente de carbono.

3-Existe un cambio direccional en el tiempo de la estructura de la comunidad microbiana asociada. Luego de la perturbación causada por el contaminante, diferentes grupos de OTUs se van reemplazando durante el proceso de fitorremediación, lo cual

podríamos denominar como una suerte de “sucesión”, al menos en el cambio de las especies en el tiempo. .

4- Existen grupos bien definidos de OTUs específicos presentes solo en el suelo plantado que se relacionan con diferentes etapas del proceso de remediación.

5- A lo largo del proceso de remediación existen grupos antagónicos de OTUs bien definidos debido a la tolerancia de los diferentes miembros de la comunidad al contaminante y la posibilidad de utilizarlas como fuente de carbono.

6- La concentración de fenantreno y su biodisponibilidad se modifican en un suelo expuesto a fitorremediación seleccionando las OTUs mejor adaptadas para vivir en las diferentes condiciones, dando lugar a una sucesión de diferentes grupos de OTUs.

7- La utilización de extractos de raíz podría ser una solución efectiva en lugares donde las plantas tienen crecimiento nulo o limitado, ya que posee características intermedias entre el sistema F2000R y F2000 en cuanto a la capacidad degradadora, actividad enzimática y un número de bacterias.

Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis constituyen un paso importante para el conocimiento de procesos ecológicos y biológicos asociados a la rizósfera durante la remediación de PAHs en suelos contaminados.

La importancia de los modelos desarrollados en el presente trabajo de tesis deriva en la futura utilización en planes restauración de suelos y/o tomar medidas necesarias acordes con el uso sustentable de este recurso natural.

5.2 Perspectivas futuras

En base a los resultados y conclusiones obtenidos en esta Tesis, se sugieren algunas líneas o sugerencias para ser desarrollados en futuros estudios:

-Teniendo en cuenta que la remediación no solo incluye la eliminación del contaminante del suelo, resulta interesante profundizar en la respuesta de la comunidad impactada y su estado después del proceso de remediación.

-Implementación de metodología incluyendo la piro-secuenciación y análisis metagenómico utilizando *big data*, *Neural Networks* y *machine learning*, podría completar la información y hacer simulaciones sobre los cambios dentro de la comunidad asociada a un suelo expuesto a biorremediación.

-El análisis de los cambios sucesionales de la comunidad microbiana en suelos contaminados podría aportar información de OTUs pioneras con potencial degradador y resistencia al contaminante, que podrían utilizarse para implementar estrategias de bioaumento.

Bibliografía:

Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades (ATSDR). Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos. 2018. [accessed 2018 Oct 30]. https://www.atsdr.cdc.gov/es/toxfaqs/es_tfacts69.html.

Agenda 2030 y los Objetivos de Desarrollo Sostenible: una oportunidad para América Latina y el Caribe. 2015 Sep 25. : 63.

Aleixo AP, Kaschuk G, Alberton O. 2014. Soil fungal and bacterial biomass determined by epifluorescence microscopy and mycorrhizal spore density in different sugarcane managements. *Ciência Rural*. 44(4):588–594.

Anderson S, Schaetzl R. 2005. Soils: genesis and geomorphology. Cambridge University Press.

Andreoni V, Cavalca L, Rao M, Nocerino G, Bernasconi S, Dell'Amico E, Colombo M, Gianfreda L. 2004. Bacterial communities and enzyme activities of PAHs polluted soils. *Chemosphere*. 57(5):401–412.

Aprill W, Sims RC. 1990. Evaluation of the use of prairie grasses for stimulating polycyclic aromatic hydrocarbon treatment in soil. *Chemosphere*. 20(1–2):253–265.

Arias Fernández ME, González-Pérez JA, González-Vila FJ, Ball AS. 2005. Soil health—a new challenge for microbiologists and chemists. *International Microbiology*. 8(1):13–21.

Arias L, Bauzá J, Tobella J, Vila J, Grifoll M. 2008. A microcosm system and an analytical protocol to assess PAH degradation and metabolite formation in soils. *Biodegradation*. 19(3):425–434.

Badri DV, Loyola-Vargas VM, Broeckling CD, De-la-Peña C, Jasinski M, Santelia D, Martinoia E, Sumner LW, Banta LM, Stermitz F. 2008. Altered profile of secondary metabolites in the root exudates of *Arabidopsis* ATP-binding cassette transporter mutants. *Plant Physiology*. 146(2):762–771.

Bashan Y, de-Bashan LE. 2010. Chapter Two - How the Plant Growth-Promoting Bacterium *Azospirillum* Promotes Plant Growth—A Critical Assessment. In: Sparks DL, editor. *Advances in Agronomy*. Vol. 108. Academic Press. p. 77–136. [Accessed 2018 Oct 30]. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065211310080028>.

- Basumatary B, Saikia R, Bordoloi S. 2012. Phytoremediation of crude oil contaminated soil using nut grass, *Cyperus rotundus*. *Journal of Environmental Biology*. 33(5):891–896.
- Begum M, Sariah M, Abidin MZ, Puteh A, Rahman M. 2008. Antagonistic Potential of Selected Fungal and Bacterial Biocontrol Agents against *Colletotrichum truncatum* of Soybean Seeds. *Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science*. 31(1):45–53.
- Bengtsson G, Bengtson P, Månsson KF. 2003. Gross nitrogen mineralization-, immobilization-, and nitrification rates as a function of soil C/N ratio and microbial activity. *Soil Biology and Biochemistry*. 35(1):143–154.
- Bokhorst S, Kardol P, Bellingham PJ, Kooyman RM, Richardson SJ, Schmidt S, Wardle DA. 2017. Responses of communities of soil organisms and plants to soil aging at two contrasting long-term chronosequences. *Soil Biology and Biochemistry*. 106(1):69–79.
- Borriss R. 2016. Phytostimulation and biocontrol by the plant-associated *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42: an update. In: *Bacilli and Agrobiotechnology*. 76(16):163–184.
- Bourceret A, Leyval C, Faure P, Lorgeoux C, Cébron A. 2018. High PAH degradation and activity of degrading bacteria during alfalfa growth where a contrasted active community developed in comparison to unplanted soil. *Environ Sci Pollut Res*. 25(29):29556–29571.
- Burchiel SW, Luster MI. 2001. Signaling by Environmental Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Human Lymphocytes. *Clinical Immunology*. 98(1):2–10.
- Carrión V, Liseth C. 2017. Evaluación del efecto de las nanopartículas metálicas de hierro elemental (NPHE) sobre la población bacteriana de suelos contaminados con TPHs (fenantreno) a nivel de laboratorio. [accessed 2018 Oct 26]. <http://repositorio.espe.edu.ec/jspui/handle/21000/12877>.
- Carter M, Gregorich E, Anderson D, Doran J, Janzen H. 1997. Concepts of soil quality and their significance. *Soil Quality for Crop Production and Ecosystem Health*. 25(1):23-25.
- Cébron A, Louvel B, Faure P, France-Lanord C, Chen Y, Murrell JC, Leyval C. 2011. Root exudates modify bacterial diversity of phenanthrene degraders in PAH-polluted soil but not phenanthrene degradation rates. *Environmental Microbiology*. 13(3):722–736.

- Chao A, Shen T-J. 2003. Nonparametric estimation of Shannon's index of diversity when there are unseen species in sample. *Environmental and ecological statistics*. 10(4):429–443.
- Chen J, Zhuang X, Xie H, Bai Z, Qi H, Zhang H. 2007. Associated impact of inorganic fertilizers and pesticides on microbial communities in soils. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 23(1):23–29.
- Chen XH, Koumoutsis A, Scholz R, Eisenreich A, Schneider K, Heinemeyer I, Morgenstern B, Voss B, Hess WR, Reva O. 2007. Comparative analysis of the complete genome sequence of the plant growth-promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Nature biotechnology*. 25(9):1007-1009.
- Ciccillo F, Fiore A, Bevivino A, Dalmastri C, Tabacchioni S, Chiarini L. 2002. Effects of two different application methods of *Burkholderia ambifaria* MCI 7 on plant growth and rhizospheric bacterial diversity. *Environmental Microbiology*. 4(4):238–245.
- Coba de la Peña T, Pueyo JJ. 2012. Legumes in the reclamation of marginal soils, from cultivar and inoculant selection to transgenic approaches. *Agronomy for Sustainable Development*. 32(1):65–91.
- Cole JR, Chai B, Farris RJ, Wang Q, Kulam SA, McGarrell DM, Garrity GM, Tiedje JM. 2005. The Ribosomal Database Project (RDP-II): sequences and tools for high-throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Research*. 33(1):294-296.
- Cook WM, Yao J, Foster BL, Holt RD, Patrick LB. 2005. Secondary succession in an experimentally fragmented landscape: community patterns across space and time. *Ecology*. 86(5):1267–1279.
- Crawford JW, Harris JA, Ritz K, Young IM. 2005. Towards an evolutionary ecology of life in soil. *Trends in Ecology & Evolution*. 20(2):81–87.
- Cruz-Leyva MC de la, Zamudio-Maya M, Corona-Cruz AI, González-de la Cruz JU, Rojas-Herrera RA. 2015a. Importancia y estudios de las comunidades microbianas en los recursos y productos pesqueros. *Ecosistemas y recursos agropecuarios*. 2(4):99–115.
- Cruz-Leyva MC de la, Zamudio-Maya M, Corona-Cruz AI, González-de la Cruz JU, Rojas-Herrera RA. 2015b. Importancia y estudios de las comunidades microbianas en los recursos y productos pesqueros. *Ecosistemas y recursos agropecuarios*. 2(4):99–115.

Cuevas-Reyes P. 2010. Importancia de la resiliencia biológica como posible indicador del estado de conservación de los ecosistemas: implicaciones en los planes de manejo y conservación de la biodiversidad. *Biológicas*. 12(1):1–7.

Cui Y, Zhang W, Sun H, Wu W-M, Zou X. 2015. Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Accumulation in *Phragmites australis* Grown on Constructed Wetland for Sludge Stabilization. *Journal of Residuals Science & Technology*. 12(4):215–220.

Curtis TP, Sloan WT, Scannell JW. 2002. Estimating prokaryotic diversity and its limits. *PNAS*. 99(16):10494–10499.

DANIEL FJJ. 2002. Introducción a la ciencia del suelo. Universidad Nacional de Colombia Facultad de Ciencias Medellín. 5(2):321–324.

Daryabeigi Zand A, Hoveidi H. 2016. Plant-Aid Remediation of Hydrocarbon-Contaminated Sites. *Pollution*. 2(3):233–246.

Dennis PG, Miller AJ, Hirsch PR. 2010. Are root exudates more important than other sources of rhizodeposits in structuring rhizosphere bacterial communities? *FEMS Microbiology Ecology*. 72(3):313–327.

D’Orazio V, Ghanem A, Senesi N. 2013. Phytoremediation of Pyrene Contaminated Soils by Different Plant Species. *CLEAN – Soil, Air and Water*. 41(4):377–382.

Drenovsky R, Vo D, Graham K, Scow K. 2004. Soil water content and organic carbon availability are major determinants of soil microbial community composition. *Microbial ecology*. 48(3):424–430.

Ely CS, Smets BF. 2017. Bacteria from wheat and cucurbit plant roots metabolize PAHs and aromatic root exudates: Implications for rhizodegradation. *International Journal of Phytoremediation*. 19(10):877–883.

Escalante, AE. 2007. Ecología molecular en el estudio de comunidades bacterianas, En: *Ecología Molecular*; Eguiarte LE, Souza V, Aguirre X. Instituto Nacional de Ecología, SEMARNAT, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO), México. DF. 6(2): 393-424.

Fan S, Li P, Gong Z, Ren W, He N. 2008. Promotion of pyrene degradation in rhizosphere of alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Chemosphere*. 71(8):1593–1598.

Fan TW-M, Lane AN, Shenker M, Bartley JP, Crowley D, Higashi RM. 2001. Comprehensive chemical profiling of gramineous plant root exudates using high-resolution NMR and MS. *Phytochemistry*. 57(2):209–221.

Fetzer John C, Fetzer John Charles. 2000. Large (C= 24) Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Chemistry and Analysis. Nueva York: John Wiley & Sons. 544-562

Fierer N, Nemergut D, Knight R, Craine JM. 2010. Changes through time: integrating microorganisms into the study of succession. *Research in microbiology*. 161(8):635–642.

Fletcher JS, Hegde RS. 1995. Release of phenols by perennial plant roots and their potential importance in bioremediation. *Chemosphere*. 31(4):3009–3016.

Fromin N, Hamelin J, Tarnawski S, Roesti D, Jourdain-Miserez K, Forestier N, Teyssier-Cuvelle S, Gillet F, Aragno M, Rossi P. 2002. Statistical analysis of denaturing gel electrophoresis (DGE) fingerprinting patterns. *Environmental Microbiology*. 4(11):634–643.

Garbeva P, Voesenek K, Elsas JD van. 2004. Quantitative detection and diversity of the pyrrolnitrin biosynthetic locus in soil under different treatments. *Soil Biology and Biochemistry*. 36(9):1453–1463.

Gholami A, De Geyter N, Pollier J, Goormachtig S, Goossens A. 2014. Natural product biosynthesis in *Medicago* species. *Natural Product Reports*. 31(3):356.

Gotelli NJ, Colwell RK. 2011. Estimating species richness. *Biological diversity: frontiers in measurement and assessment*. 12(1):39–54.

Guo M, Gong Z, Miao R, Su D, Li X, Jia C, Zhuang J. 2017. The influence of root exudates of maize and soybean on polycyclic aromatic hydrocarbons degradation and soil bacterial community structure. *Ecological Engineering*. 99(1):22–30.

Gupta V, Yeates G. 1997. Soil microfauna as bioindicators of soil health. Cab International, Wallingford, UK.

Hamdi H, Benzarti S, Aoyama I, Jedidi N. 2012. Rehabilitation of degraded soils containing aged PAHs based on phytoremediation with alfalfa (*Medicago sativa* L.). *International Biodeterioration & Biodegradation*. 67(2):40–47.

Haritash A, Kaushik C. 2009. Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. *Journal of hazardous materials*. 169(3):1-15.

Hartmann A, Rothballer M, Schmid M. 2008. Lorenz Hiltner, a pioneer in rhizosphere microbial ecology and soil bacteriology research. *Plant Soil*. 312(1):7–14.

Hawes MC, Gunawardena U, Miyasaka S, Zhao X. 2000. The role of root border cells in plant defense. *Trends in Plant Science*. 5(3):128–133.

Haygarth PM, Ritz K. 2009. The future of soils and land use in the UK: soil systems for the provision of land-based ecosystem services. *Land use policy*. 26(1):187–197.

Hernández M, Dumont MG, Yuan Q, Conrad R. 2015. Different bacterial populations associated with the roots and rhizosphere of rice incorporate plant-derived carbon. *Environmental Microbiology*. 81(6):2244–2253.

Hernández Valencia I, Navas G, Infante C. 2017. FITORREMEDIACIÓN DE UN SUELO CONTAMINADO CON PETRÓLEO EXTRA PESADO CON *Megathyrus maximus*. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. 33(3):495–503.

Hernández-Vega JC, Cady B, Kayanja G, Mauriello A, Cervantes N, Gillespie A, Lavia L, Trujillo J, Alkio M, Colón-Carmona A. 2017. Detoxification of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in *Arabidopsis thaliana* involves a putative flavonol synthase. *Journal of Hazardous Materials*. 321(2):268–280.

Heuer H, Wieland G, Schönfeld J, Schönwälder A, Gomes N, Smalla K. 2001. Bacterial community profiling using DGGE or TGGE analysis. *Environmental molecular microbiology: protocols and applications*. 9(3):177–190.

Hinsinger P, Bengough AG, Vetterlein D, Young IM. 2009. Rhizosphere: biophysics, biogeochemistry and ecological relevance. *Plant Soil*. 321(1):117–152.

Hobbs RJ, Walker LR, Walker J. 2007. Integrating restoration and succession. Linking restoration and ecological succession. 32(2):168–179.

Hoorman JJ, de Moraes JC, Reeder R. 2011. The Biology of Soil Compaction. *Journal of Agriculture*. 9(2):583–587.

Huaranga Yc, Surco Vq, Liza Sec. 2017. Biorremediación mediante la asociación entre microorganismos y plantas. Repositorio de revistas de la universidad privada de pucallpa. 1(02). Accessed 2018 Oct 4].

<http://Www.Uppvirtual.Org/Revistas/Index.Php/Riccva/Article/View/23>.

Ibarrolaza A, Donatti E, Morelli I. 2005. Efecto de la concentración de cromo sobre la biorremediación de suelos contaminados con fenantreno. Congreso; V Reunión Nacional Científico Técnica de Biología del suelo. San Salvador de Jujuy. 24-25

International Union of Pure and Applied Chemistry. Commission on the Nomenclature of Organic Chemistry. 1993. A guide to IUPAC nomenclature of organic compounds : recommendations 1993 /. Oxford ; Blackwell Scientific Publications.

Johnsen K, Jacobsen CS, Torsvik V, Sørensen J. 2001. Pesticide effects on bacterial diversity in agricultural soils – a review. *Biol Fertil Soils*. 33(6):443–453.

Joner EJ, Corgié SC, Amellal N, Leyval C. 2002. Nutritional constraints to degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in a simulated rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry*. 34(6):859–864.

Jones JD, Dangl JL. 2006. The plant immune system. *Nature*. 444:(7117):323–329.

Jungk AO. 2002. Dynamics of Nutrient Movement at the Soil-Root Interface. Marcel Dekker, Inc.: New York. 325-346

Kamath R, Schnoor JL, Alvarez PJ. 2004. Effect of root-derived substrates on the expression of nah-lux genes in *Pseudomonas fluorescens* HK44: implications for PAH biodegradation in the rhizosphere. *Environmental science & technology*. 38(6):1740–1745.

Kassam, A., & Friedrich, T. 2011. Conservation agriculture: Principles, sustainable land management and ecosystem services. In *Proceedings of the 40th National Convention of the Italian Agronomy Society* (7-9).

Kathi S, Khan AB. 2011. Phytoremediation Approaches to PAH Contaminated Soil. *Indian Journal of Science and Technology*. 4(1):56-63–63.

Kent AD, Triplett EW. 2002. Microbial Communities and Their Interactions in Soil and Rhizosphere Ecosystems. *Annual Review of Microbiology*. 56(1):211–236.

Kiely PD, Haynes JM, Higgins CH, Franks A, Mark GL, Morrissey JP, O’Gara F. 2006. Exploiting New Systems-Based Strategies to Elucidate Plant-Bacterial Interactions in the Rhizosphere. *Microbial Ecology*. 51(3):257–266.

Kim D-H, Brunt J, Austin B. 2007. Microbial diversity of intestinal contents and mucus in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Applied Microbiology*. 102(6):1654–1664.

Kim J, Verma SB. 1992. Soil surface CO₂ flux in a Minnesota peatland. *Biogeochemistry*. 18(1):37–51.

Kraker-Castañeda C, Cobar-Carranza A. 2011. Uso de rarefacción para comparación de la riqueza de especies: el caso de las aves de sotobosque en la zona de influencia del Parque Nacional Laguna Lachuá, Guatemala. *Naturaleza y Desarrollo*. 9(1):60–70.

Lambers H, Raven JA, Shaver GR, Smith SE. 2008. Plant nutrient-acquisition strategies change with soil age. *Trends in Ecology & Evolution*. 23(2):95–103.

Ledezma EZ. 2008 Mar. Biorremediación múlti-procesos de mezclas suelo-ripio, utilizando biorize® como mejorador de la biodegradación. *Environmental science & technology* 126(3): 45-49.

Liao H, Zheng C, Li J, Long J. 2018. Dynamics of soil microbial recovery from cropland to orchard along a 20-year chronosequence in a degraded karst ecosystem. *Science of The Total Environment*. 639(2):1051–1059.

Linné CV. 1753. *Species plantarum: exhibentes plantas rite cognitae, ad genera relatas, cum differentiis specificis, nominibus trivialibus, synonymis selectis, locis natalibus, secundum systema sexuale digestas*. Holmiae : Impensis Laurentii Salvii,

Liu C, Timper P, Ji P, Mekete T, Joseph S. 2017. Influence of Root Exudates and Soil on Attachment of *Pasteuria penetrans* to *Meloidogyne arenaria*. *Journal of nematology*. 49(3):304.

Liu R, Dai Y, Sun L. 2015. Effect of Rhizosphere Enzymes on Phytoremediation in PAH-Contaminated Soil Using Five Plant Species. *Plos One*. 10(3):12-19.

Liu S, Cao Z, Liu H. 2013. Effect of ryegrass (*Lolium multiflorum* L.) growth on degradation of phenanthrene and enzyme activity in soil. *Plant Soil Environ*. 59(6):247–253.

Lobo AP. 2012. La rizósfera: un “criptoecosistema” vital. Aspectos básicos y aplicados. Congreso nacional de medio ambiente San Pablo. 17-19.

Louvel B, Cébron A, Leyval C. 2011. Root exudates affect phenanthrene biodegradation, bacterial community and functional gene expression in sand microcosms. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 65(7):947–953.

Lundstedt S, White PA, Lemieux CL, Lynes KD, Lambert IB, Öberg L, Haglund P, Tysklind M. 2007. Sources, Fate, and Toxic Hazards of Oxygenated Polycyclic Aromatic

Hydrocarbons (PAHs) at PAH- contaminated Sites. *AMBIO: A Journal of the Human Environment*. 36(6):475–485.

Lyautey E, Lacoste B, Ten-Hage L, Rols J-L, Garabetian F. 2005. Analysis of bacterial diversity in river biofilms using 16S rDNA PCR-DGGE: methodological settings and fingerprints interpretation. *Water Research*. 39(2):380–388.

Lynch J, Whipps J. 1990. Substrate flow in the rhizosphere. *Plant and soil*. 129(1):1–10.

Magurran AE. 2004. Measuring Biological Diversity. *African Journal of Aquatic Science*. 29(2):35-39.

Magurran AE. 2013. Measuring Biological Diversity. John Wiley & Sons USA.

Maharning AR, Mills AA, Adl SM. 2009. Soil community changes during secondary succession to naturalized grasslands. *Applied Soil Ecology*. 41(2):137–147.

Maldonado-Chávez E, Rivera-Cruz MC, Izquierdo-Reyes F, Palma-López DJ. 2010. Efectos de rizósfera, microorganismos y fertilización en la biorremediación y fitorremediación de suelos con petróleos crudo nuevo e intemperizado. *Universidad y ciencia*. 26(2):121–136.

Mallick S, Chatterjee S, Dutta TK. 2007. A novel degradation pathway in the assimilation of phenanthrene by *Staphylococcus* sp. strain PN/Y via meta-cleavage of 2-hydroxy-1-naphthoic acid: formation of trans-2,3-dioxo-5-(2'-hydroxyphenyl)-pent-4-enoic acid. *Microbiology*. 153(7):2104–2115.

Marschner H. 2005. Nutrición mineral de plantas superiores (Academic Press, Londres), Ed 2.

Martin BC, George SJ, Price CA, Ryan MH, Tibbett M. 2014. The role of root exuded low molecular weight organic anions in facilitating petroleum hydrocarbon degradation: Current knowledge and future directions. *Science of The Total Environment*. 472(1):642–653.

Masu S, Grecu E, Oncioiu I. 2016. For a sustainable development: Phytoremediation of oil-polluted soils by using birdsfoot trefoil crops. *Romanian Biotechnological Letters*. 22(6):8-12.

Miller GT, Spoolman S. 2011. Essentials of ecology. Cengage Learning.

Mueller KE, Shann JR. 2006. PAH dissipation in spiked soil: Impacts of bioavailability, microbial activity, and trees. *Chemosphere*. 64(6):1006–1014.

Mullis K, Erlich H, Arnheim N, Horn G, Saiki R, Scharf S. 1987. Process for amplifying, detecting, and/or-cloning nucleic acid sequences. U.S. Patent 828144.

Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. 1986. Specific Enzymatic Amplification of DNA In Vitro: The Polymerase Chain Reaction. *Cold Spring Harb Symp Quantitative biology*. 51(2):263–273.

Mullis KB. 1990. The Unusual Origin of the Polymerase Chain Reaction. *Scientific American*. 262(4):56–65.

Muratova A, Dubrovskaya E, Golubev S, Grinev V, Chernyshova M, Turkovskaya O. 2015. The coupling of the plant and microbial catabolisms of phenanthrene in the rhizosphere of *Medicago sativa*. *Journal of Plant Physiology*. 188(1):1–8.

Muyzer G, Waal EC de, Uitterlinden AG. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*. 59(3):695–700.

Nannipieri P, Ascher J, Ceccherini M, Landi L, Pietramellara G, Renella G. 2003. Microbial diversity and soil functions. *European journal of soil science*. 54(4):655–670.

Nardi S, Concheri G, Pizzeghello D, Sturaro A, Rella R, Parvoli G. 2000. Movilización de materia orgánica del suelo por exudados de raíz. *Chemosphere* 5(1): 653-658.

Núñez-Colín CA, Barrientos-Priego AF. 2006. Estimación de la variabilidad interna de muestras poblacionales, mediante análisis de componentes principales. *Interciencia*. 31(11):817–821.

Odum EP. 1993. *The ecosystem. Ecology and Our Endangered Life-support Systems* (2nd edition) Sunderland, MA, USA.

Oliveros-Bastidas A de J, Macías FA, Fernández CC, Marín D, Molinillo JMG. 2009. Exudados de la raíz y su relevancia actual en las interacciones alelopáticas. *Química Nova*. 32(1):198–213.

Ortiz-Álvarez R, Fierer N, de los Ríos A, Casamayor EO, Barberán A. 2018. Consistent changes in the taxonomic structure and functional attributes of bacterial communities during primary succession. *The ISME journal*. 12(2):1658–1667.

- Ortíz-Maya J, Escalante-Espinosa E, Fócil-Monterrubio RL, Ramírez-Saad HC, Díaz Ramírez IJ, Ortíz-Maya J, Escalante-Espinosa E, Fócil-Monterrubio RL, Ramírez-Saad HC, Díaz Ramírez IJ. 2017. Dinámica de poblaciones bacterianas y actividad deshidrogenasa durante la biorremediación de suelo recién contaminado e intemperizado con hidrocarburos. *Revista internacional de contaminación ambiental*. 33(2):237–246.
- Ouvrard S, Leglize P, Morel JL. 2014. PAH Phytoremediation: Rhizodegradation or Rhizoattenuation? *International Journal of Phytoremediation*. 16(1):46–61.
- Pérez-Morales López G, Morales Gómez P, Haza Duaso AI. 2016. Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) (I): Toxicidad, exposición de la población y alimentos implicados. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*. 10(1):11-15.
- Phillips LA, Greer CW, Farrell RE, Germida JJ. 2012. Plant root exudates impact the hydrocarbon degradation potential of a weathered-hydrocarbon contaminated soil. *Applied Soil Ecology*. 52(1):56–64.
- Pickett ST, Cadenasso ML, Meiners S. 2005. Vegetation dynamics. *Vegetation ecology*. 22(3):172–198.
- Purves WK, Sadava DE, Orians GH, Heller HC. 2003. *Life: The Science of Biology*, 7th Edition. Seventh edition. Sunderland, Mass. : Gordonsville, VA: Sinauer Associates and W. H. Freeman.
- Rainer B. 2017. Plant Growth Promoting Bacteria – Early Investigations, Present state and Future prospects. *Vegetos- An International Journal of Plant Research*. 30(1):211–215.
- Razzaq R. 2017. Phytoremediation: An environmental friendly technique-A review. *Journal of Environmental Analytical Chemistry*. 4(2):195.
- Reasoner DJ, Geldreich EE. 1985. A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. *Appl Environ Microbiol*. 49(1):1–7.
- Rentz JA, Alvarez PJJ, Schnoor JL. 2004. Repression of *Pseudomonas putida* phenanthrene-degrading activity by plant root extracts and exudates. *Environmental Microbiology*. 6(6):574–583.

Rentz JA, Alvarez PJJ, Schnoor JL. 2005. Benzo[a]pyrene co-metabolism in the presence of plant root extracts and exudates: Implications for phytoremediation. *Environmental Pollution*. 136(3):477–484.

Rezek J, in der Wiesche C, Mackova M, Zadrazil F, Macek T. 2008. The effect of ryegrass (*Lolium perenne*) on decrease of PAH content in long-term contaminated soil. *Chemosphere*. 70(9):1603–1608.

Rock S; P, Environmental Protection Agency, Washington, DC. Office of Research and Development, ManTech Environmental Research Services Corp., Ada, OK. 2000. Introduction to phytoremediation. National Risk Management Research Laboratory, Office of Research and Development, U.S. Environmental Protection Agency Report No.: EPA 600/R-99/107.

Ronald L. Crawford. 2002. *Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis, and Bioseparation*. 2002nd ed. John Wiley & Sons, Inc.

Sahney S, Benton MJ. 2008. Recovery from the most profound mass extinction of all time. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*. 275(1636):759–765.

Salt GW. 1979. A comment on the use of the term emergent properties. *The American Naturalist*. 113(1):145–148.

Sanchez R, Rodriguez T, Leal E, Cruz CM, Esparza R. 2010. Determinación de subproductos de biotransformación del fenantreno por *Mucorrouxi* IM-80. Segundo Congreso Q Roo; 2010; Cancún, Mexico. Sociedad Latinoamericana de Biotecnología Ambiental y Algal (SOLABIAA).

Segura A, Rodríguez-Conde S, Ramos C, Ramos JL. 2009. Bacterial responses and interactions with plants during rhizoremediation. *Microbial Biotechnology*. 2(4):452–464.

Shi S, Richardson AE, O'Callaghan M, DeAngelis KM, Jones EE, Stewart A, Firestone MK, Condon LM. 2011. Effects of selected root exudate components on soil bacterial communities. *FEMS Microbiology ecology*. 77(3):600–610.

Siciliano SD, Germida JJ, Banks K, Greer CW. 2003. Changes in microbial community composition and function during a polycyclic aromatic hydrocarbon phytoremediation field trial. *Applied and Environmental Microbiology*. 69(1):483–489.

Simonet P. 2016. Exploring the Soil's Genetic Biodiversity - CNRS Web site - CNRS. [accessed 2018 Oct 29]. <http://www2.cnrs.fr/en/1600.htm>.

Six J, Elliott E, Paustian K. 2000. Soil structure and soil organic matter II. A normalized stability index and the effect of mineralogy. *Soil Science Society of America Journal*. 64(3):1042–1049.

Smalla K, Wieland G, Buchner A, Zock A, Parzy J, Kaiser S, Roskot N, Heuer H, Berg G. 2001. Bulk and rhizosphere soil bacterial communities studied by denaturing gradient gel electrophoresis: plant-dependent enrichment and seasonal shifts revealed. *Applied and environmental microbiology*. 67(10):4742–4751.

Stöcker G, Digby P, Kempton R. 1990. Multivariate Analysis of Ecological Communities. *Biometrical Journal*, 32(1): 94-94.

Sugiyama A, Yazaki K. 2012. Root Exudates of Legume Plants and Their Involvement in Interactions with Soil Microbes. In: Vivanco JM, Baluška F, editors. *Secretions and Exudates in Biological Systems*. Berlin Heidelberg. 12(1):27–48.

Ter Braak CJ. 1986. Canonical correspondence analysis: a new eigenvector technique for multivariate direct gradient analysis. *Ecology*. 67(5):1167–1179.

Thalmann A. 1968. Zur Methodik der Bestimmung der Dehydrogenaseaktivität im Boden mittels triphenyltetrazoliumchlorid (TTC). *Landwirtsch Forsch*. 21(1):249–258.

Thijs S, Sillen W, Weyens N, Vangronsveld J. 2017. Phytoremediation: State-of-the-art and a key role for the plant microbiome in future trends and research prospects. *International Journal of Phytoremediation*. 19(1):23–38.

Thomas F, Cébron A. 2016. Short-term rhizosphere effect on available carbon sources, phenanthrene degradation, and active microbiome in an aged-contaminated industrial soil. *Frontiers in microbiology*. 7(1):92-96.

Thomas JC, Cable E, Dabkowski RT, Gargala S, McCall D, Pangrazzi G, Pierson A, Ripper M, Russell DK, Rugh CL. 2013. Native Michigan plants stimulate soil microbial species changes and PAH remediation at a legacy steel mill. *International journal of phytoremediation*. 15(1):5–23.

Torsvik V, Øvreås L. 2002. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Current Opinion in Microbiology*. 5(3):240–245.

Truu J, Truu M, Espenberg M, Nõlvak H, Juhanson J. 2015. Phytoremediation and Plant-Assisted Bioremediation in Soil and Treatment Wetlands: A Review. *The Open Biotechnology Journal*. 9(1):85–92.

Uren NC. 2007. 1 Types, Amounts, and Possible Functions of Compounds Released into the Rhizosphere by Soil-Grown Plants. *The Rhizosphere: Biochemistry and Organic Substances at the Soil-Plant Interface*: 1.

US EPA O. 1986 Sep. U.S. Environmental Protection Agency. U.S. EPA Method 8310, “Polynuclear Aromatic Hydrocarbons Using HPLC,.” US EPA. [Accessed 2018 Oct 29]. <https://www.epa.gov/hw-sw846/sw-846-test-method-8310-polynuclear-aromatic-hydrocarbons>.

Verboom WH, Pate JS. 2006. Evidence of active biotic influences in pedogenetic processes. Case studies from semiarid ecosystems of south-west Western Australia. *Plant and Soil*. 289(1–2):103–121.

Villalaz CC. 2004. *Mecánica de suelos y cimentaciones*. Editorial Limusa.

Viñas Canals M. 2005. *Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos: caracterización microbiológica, química y ecotoxicológica*. Universitat de Barcelona. [Accessed 2018 Oct 26]. <http://diposit.ub.edu/dspace/handle/2445/42392>.

Vinas M, Sabate J, Espuny MJ, Solanas AM. 2005. Bacterial Community Dynamics and Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Degradation during Bioremediation of Heavily Creosote-Contaminated Soil. *Applied and Environmental Microbiology*. 71(11):7008–7018.

Walker LR, Del Moral R. 2003. *Primary succession and ecosystem rehabilitation*. Cambridge University Press.

Wang J-M, Marlowe EM, Miller-Maier RM, Brusseau ML. 1998. Cyclodextrin-Enhanced Biodegradation of Phenanthrene. *Environmental Science & Technology*. 32(13):1907–1912.

Watt M, Kirkegaard JA, Passioura JB. 2006. Rhizosphere biology and crop productivity—a review. *Soil Research*. 44(4):299–317.

Wei R, Ni J, Guo L, Yang L, Yang Y. 2014. The effect of aging time on the distribution of pyrene in soil particle-size fractions. *Geoderma*. 232(1):19–23.

- Wei R, Ni J, Li X, Chen W, Yang Y. 2017. Dissipation and phytoremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons in freshly spiked and long-term field-contaminated soils. *Environ Sci Pollut Res*. 24(9):7994–8003.
- Wilding LP, Smeck NE, Hall G. 1983. *Pedogenesis and soil taxonomy: the soil orders*. Elsevier.
- Wrenn BA, Venosa AD. 1996. Selective enumeration of aromatic and aliphatic hydrocarbon degrading bacteria by a most-probable-number procedure. *Canadian Journal of Microbiology*. 42(3):252–258.
- Wu T, Chellemi DO, Graham JH, Martin KJ, Roskopf EN. 2008. Comparison of soil bacterial communities under diverse agricultural land management and crop production practices. *Microbial Ecology*. 55(2):293–310.
- Xie X, Liao M, Yang J, Chai J, Fang S, Wang R. 2012. Influence of root-exudates concentration on pyrene degradation and soil microbial characteristics in pyrene contaminated soil. *Chemosphere*. 88(10):1190–1195.
- Yang G, Bao B, Peatman E, Li H, Huang L, Ren D. 2007. Analysis of the composition of the bacterial community in puffer fish *Takifugu obscurus*. *Aquaculture*. 262(2):183–191.
- Yaron B, Calvet R, Prost R, Prost R. 1996. *Soil pollution: processes and dynamics*. Springer Science & Business Media.
- Young IM, Crawford JW. 2004. Interactions and Self-Organization in the Soil-Microbe journal *Complex Science*. 304(5677):1634–1637.
- Young TP, Chase JM, Huddleston RT. 2001. Community succession and assembly comparing, contrasting and combining paradigms in the context of ecological restoration. *Ecological restoration*. 19(1):5–18.
- Zamani J, Hajabbasi MA, Mosaddeghi MR, Soleimani M, Shirvani M, Schulin R. 2018. Experimentation on Degradation of Petroleum in Contaminated Soils in the Root Zone of Maize (*Zea Mays* L.) Inoculated with *Piriformospora Indica*. *Soil and Sediment Contamination: An International Journal*. 27(1):13–30.
- Zhang C, Liu G, Xue S, Wang G. 2016. Soil bacterial community dynamics reflect changes in plant community and soil properties during the secondary succession of abandoned farmland in the Loess Plateau. *Soil Biology and Biochemistry*. 97(1):40–49.

Zhou J, Deng Y, Zhang P, Xue K, Liang Y, Van Nostrand JD, Yang Y, He Z, Wu L, Stahl DA. 2014. Stochasticity, succession, and environmental perturbations in a fluidic ecosystem. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 111(9):836–845.

Zhu W, Lu H, Hill J, Guo X, Wang H, Wu W. 2014. ¹³C pulse-chase labeling comparative assessment of the active methanogenic archaeal community composition in the transgenic and nontransgenic parental rice rhizospheres. *FEMS Microbiology ecology*. 87(3):746–756.